

公開シンポジウム

「ポストゲノム時代の害虫防除研究のあり方」
第1回 昆虫ゲノム情報と総合的害虫管理技術 IPM
講演要旨集

開催日：平成 21 年 4 月 24 日

場所：秋葉原コンベンションホール 5A

主催：(独) 農業生物資源研究所、(独) 農業環境技術研究所

はじめに

カイコは産業上の重要な昆虫であるとともに、大きな被害をもたらす鱗翅目農業害虫のモデル生物でもあります。農業生物資源研究所では、カイコゲノム研究を推進し、全ゲノム塩基配列情報、連鎖地図、BAC 物理地図、発現遺伝子情報等が統合されたデータベースの整備を進めて、データの利用が可能になっています。また、国外においてはアブラムシや寄生蜂など農業上重要な昆虫種のゲノム解読も行われています。以上のような状況を背景にして、カイコおよび他種昆虫のゲノム情報の活用による、環境負荷の低い新しい害虫防除手法の実現の可能性が急速に高まっています。

そこで、独法、大学、県、民間に所属する研究者が、それぞれの立場で情報の提供と収集を行い、害虫防除に関わる農業現場のニーズ、社会的ニーズ、技術的ニーズ及びシーズを相互に把握し、ゲノム情報から害虫防除の実現に至る研究開発の道筋を検討することを目的に、2回にわたってシンポジウムを開催致します。

第1回 昆虫ゲノム情報と総合的害虫管理技術 IPM

プログラム・目次

- 9:50 - 10:00 開会挨拶
- 10:00 - 10:40 講演1. 昆虫ゲノム研究の現状とウンカ研究の今後
農業生物資源研究所 野田博明・・・ 1-10
- 10:40 - 11:20 講演2. 野菜害虫の IPM とゲノム研究
農研機構野菜茶業研究所 本多健一郎・・・ 11-14
- 11:20 - 12:00 講演3. ゲノム研究と天敵利用
農業生物資源研究所 日本典秀・・・ 15-20
- 12:00 - 13:00 昼食
- 13:00 - 13:40 講演4. 耐虫性の作物品種を利用した害虫防除
農業生物資源研究所 田村泰盛・・・ 21-26
- 13:40 - 14:20 講演5. バキュロウイルスの宿主制御メカニズムの解明
東京大学大学院農学生命科学研究科 勝間進・・・ 27-32
- 14:20 - 15:00 講演6. 害虫によるウイルス媒介メカニズムの解明とゲノム研究
農業生物資源研究所 中島信彦・・・ 33-40
- 15:00 - 15:20 休憩
- 15:20 - 16:00 講演7. 細胞内共生微生物による害虫防除とゲノム研究
静岡大学農学部 田上陽介・・・ 41-46
- 16:00 - 16:40 講演8. 遺伝子組換え技術を使った害虫防除
農業生物資源研究所 畠山正統・・・ 47-50
- 16:40 - 17:10 総合討論
- 17:10 - 17:20 閉会挨拶

昆虫ゲノム研究の現状とウンカ研究の今後

農業生物資源研究所 野田博明

はじめに

ヒトゲノム解読が完了し (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001)、ゲノムに関する話題がしばしば報道されるようになって、ゲノムという言葉が身近なものになりつつある。ヒトゲノム解読は、医療や健康管理など身近な問題に影響を与えつつある (加納, 2008)。ゲノム情報に基づいた医薬開発、いわゆるゲノム創薬が盛んに研究されるようになった。昆虫の分野ではどうであろうか。ヒトゲノム解読の前年、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の全ゲノム解読が発表された (Adams et al., 2000)。これは、画期的な成果で、これまでの、クローン解析を中心とする解読方法に代わって、全ゲノムショットガン解析法 (WGS) が、微生物だけではなく、大型生物でも有効であることが示されたのである。このことが、ヒトゲノム計画に大きな影響を与え、全ゲノム解読を加速した (Venter et al., 2001)。このころからショウジョウバエをはじめとするモデル生物では、遺伝子やタンパク質などを多数同時に研究するような網羅的解析といわれる研究が盛んになった。ゲノム情報が公開されている生物では、遺伝子個々の機能を明らかにし、その生物の特性や全体性に対してどのように働きかけているか、また、生物間でどのような遺伝子の使い方に違いがあるか、相互のネットワークがどのようになっているかなどに研究の中心が移っている。昆虫学 (害虫学) 分野における、ゲノム研究の現状を概観し、今後の展望を俯瞰するのが、本シンポジウムでの本発表に課せられたテーマである。内外の昆虫ゲノムの現状を紹介し、昆虫ゲノム研究から生み出される成果をもとに、害虫防除にいかに取り組みべきかについても考えたい。

ゲノム研究の現状

2000年にショウジョウバエのゲノム解読が完了し、2002年にはマラリア媒介虫であるハマダラカ *Anopheles gambiae* の全ゲノムが解読された (Holt et al., 2002)。2002年には、タバコガの一種 *Heliothis virescens* において、ゲノム解読が行われたというニュースが報道された。これは、世界的な製薬メーカーのバイエルと薬品開発に関わる Exelixis という会社とのジョイントベンチャーによるものであった。残念ながらデータは公表されていない。ちょうどこの頃、農林水産省では、ゲノム情報の重要性に鑑み、「昆虫テクノロジー研究」プロジェクトを立ち上げ、鱗翅目 (チョウ目) 昆虫の代表であるカイコのゲノム情報とゲノム創薬開発の基盤整備を開始したところであった。すでに、この時期に農薬開発におけるゲノム情報の重要性が一部農薬メーカーでは強く認識されていたといえる。ゲノム解読は、他の昆虫でも進められ、ミツバチ *Apis mellifera* は2006年に (The honeybee genome sequencing consortium, 2006)、ネッタイシマカ *Aedes aegypti* が2007年に (Nene et al., 2007)、そしてコクヌストモドキ *Tribolium castaneum* は2008年に (Tribolium genome sequencing consortium, 2008) 論文が公表されている。節足動物のゲノム解析の現状に関しては、昨年 (2009年) の第2回 Arthropod Genomics Conference での状況について、蚕糸・

昆虫バイオテック77巻2号にとりまとめた(野田・三田, 2008)。ここでは、National Center for Biotechnology Information (NCBI) で公開されている情報に基づき、現在進行中のゲノム解読プロジェクトの状況を紹介します。2009年4月初旬のNCBI閲覧情報では、ゲノム解読が行われたかあるいは進行中のものは、合わせて59種・系統あり、完了しているものが1種(キイロショウジョウバエ)、アセンブリー中(シーケンスデータのとりまとめ中)のものが31種、シーケンス中のものが27種となっている。この中には、ショウジョウバエが系統も合わせると38もある。また、ヤドリコバチ *Nasonia* 属が3種含まれている。ダニではマダニの一種 *Ixodes scapularis* でゲノム解読が進んでいる。このマダニはライム病やエーリキア症の病原を媒介するので、アメリカでは盛んに研究されている。残念ながらこの *Ix. scapularis* はゲノムサイズがショウジョウバエの10倍以上あり、反復配列が多いのでアセンブルに困難を伴っていると言われている。ショウジョウバエ類と *Nasonia* の2種(解読のレベルが x 1 程度でシーケンス量が少ない)を除くと、現在約15種の昆虫とダニ1種でゲノム解読が行われていることになる(表1)。

表1. ゲノム解析が進行中の昆虫・ダニ (NCBI 2009)

ハチ目	<i>Apis mellifera</i>
	<i>Nasonia vitripennis</i>
チョウ目	<i>Bombyx mori</i>
	<i>Bicyclus anynana</i> (the tropical butterfly)
	<i>Melitaea cinxia</i> (the "checkerspot" butterfly)
コウチュウ目	<i>Tribolium castaneum</i>
ハエ目	<i>Drosophila</i> 23 species
	<i>Anopheles gambiae</i>
	<i>Culex quinquefasciatus</i>
	<i>Aedes aegypti</i>
	<i>Cochliomyia hominivorax</i> (the screw worm)
	<i>Haematobia irritans</i> (the horn fly)
カメムシ目	<i>Rhodnius prolixus</i>
	<i>Acyrtosiphon pisum</i>
	<i>Diaphorina citri</i> (the Asian citrus psyllid)
シラミ目	<i>Pediculus humanus corporis</i> (human body louse)
ダニ目	<i>Ixodes scapularis</i>

NCBIのゲノムプロジェクトとして公開はされていないが、新世代シーケンサーを用いて、オオカバマダラ *Danaus plexippus* とドクチョウの一種である *Heliconius melpomene* のゲノムが解読されているとのことである(三田、私信)。また、タバコスズメガ *Manduca sexta*

において、新世代シーケンサーによるゲノム解読が予定されている。ゲノム解読が行われている昆虫類（ダニを含む）を見ると、これまでモデルとして生物学の対象とされてきたものと、衛生害虫が多い。カイコはその詳細な情報が他の鱗翅目の農業害虫にも有用ではないかと期待されているが、純粋に農業害虫を対象としたものは、ミカンキジラミ *Diaphorina citri* だけである。これは、世界的に問題となっているカンキツグリーンング病の媒介虫である。

わが国の昆虫ゲノム研究

わが国では線虫 *C. elegans* のゲノム研究は行われていたが、昆虫のゲノムに関してはほとんど研究されておらず、昆虫ゲノム研究はかなり遅れて始まった感がある。しかし、故前田進カリフォルニア大学教授（理化学研究所主任）が、カイコのゲノム研究を始めたいと話されていたのは13～14年前のことである。当時、放射線医学研究所におられた三田和英氏と東京大学農学部（現農学）の嶋田透氏らとともにカイコのEST（expressed sequence tag）解析が始まった。その後、農業生物資源研究所（生物研）に移られた三田氏と東京大学の嶋田氏を中心に、広範なEST解析、マイクロアレイ解析へと繋がっていった（Mita et al., 2003）。カイコのゲノム研究が大きく進展したのは、農林水産省の委託プロジェクト「昆虫テクノロジープロジェクト（研究代表者川崎建次郎）」に負うところが大きい。また、生物研の関係者の努力により、農水省からの予算でカイコのホールゲノムショットガンによるシーケンス解析が行われ、その成果が公表された（Mita et al., 2004）。同じ頃中国でもシーケンス解析が行われ（Xia et al., 2004）、ドラフトシーケンスがそれぞれ公開された。三田らによってカイコのゲノムリソース（BACライブラリー、完全長cDNAライブラリー、ESTライブラリー、遺伝子地図、SNPマーカー）の拡充が行われ、動物のゲノムリソースとしても高いレベルのものが整備されている（Yamamoto et al., 2008）。日本と中国で独自に行われたデータをあわせて、より高度なゲノムデータとして統合されたものが、昨年末に公表され（The international silkworm consortium, 2008）、インターネットでも公開されている（<http://sgp.dna.affrc.go.jp/KAIKObase/>）。同時に *Insect Biochemistry and Molecular Biology* の同じ巻号に、カイコゲノムに関する13の論文が出版された（2008年12月号）。高度なゲノム配列情報が作成でき、次にはま遺伝子のアノテーション情報を含む、ゲノム上の各種情報の整備が必要である。その他の昆虫に関しては、わが国ではほとんどゲノム研究が行われていないが、トビイロウンカのEST解析がゲノム研究の例としてあげられるであろう。トビイロウンカのEST解析については後述するが、生物研では、ほかにも害虫・昆虫のEST解析が行われている。しかし、まだ整備が十分ではなく、利用は一部の研究者に限られている。カイコのような全ゲノム解析は費用がかかり、特定のモデル昆虫や経済的に重要な昆虫種以外では、現時点では費用をまかなうのは困難である。そのような場合、EST解析は有効な手段である。研究室単位でも実施可能で、有用なゲノム情報である。ただし、発現量の高い遺伝子の塩基配列情報は得られるが、転写因子など低発現量の遺伝子情報を得にくいという問題点もある。現在までにNCBIに登録されている昆虫類のEST解析状況を表2に示した。登録されたEST数からみて、カイコは上位3位に、トビイロウンカは16位に位置する。

表 2. NCBIに登録されているEST数の多い昆虫とダニ (2009)

<i>Drosophila melanogaster</i> (fruit fly)	820, 591
<i>Aedes aegypti</i> (yellow fever mosquito)	301, 342
<i>Bombyx mori</i> (domestic silkworm)	245, 761
<i>Culex quinquefasciatus</i>	204, 742
<i>Ixodes scapularis</i> (black-legged tick)	193, 773
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	169, 599
<i>Anopheles gambiae</i> (malaria mosquito)	153, 165
<i>Nasonia vitripennis</i>	145, 793
<i>Drosophila simulans</i>	118, 742
<i>Apis mellifera</i>	78, 191
<i>Tribolium castaneum</i>	64, 571
<i>Rhipicephalus microplus</i>	52, 629
<i>Locusta migratoria</i>	45, 708
<i>Drosophila sechellia</i>	38, 257
<i>Drosophila auraria</i>	38, 110
<i>Nilaparvata lugens</i>	37, 312
<i>Drosophila pseudoobscura</i>	35, 042
<i>Ambystoma mexicanum</i>	34, 683
<i>Spodoptera frugiperda</i>	32, 255
<i>Nasonia giraulti</i>	30, 060

農業害虫のゲノム研究の今後

ゲノム解読の中心はモデル昆虫で、衛生害虫のゲノム研究も推進されている。農業害虫のゲノム研究は遅れているが、これは、以下のような理由によるものと思われる。まず、農業害虫は作物ごとに害虫種がおおく、特定のワースト害虫だけを対象としても作物防除が成り立たない場合があること、そして、個々の害虫ごとにゲノム研究を行うことは効率的ではなく、費用対効果が小さいことが上げられる。また、これまで農業害虫研究では、害虫管理学、生態学などが主体で分子生物学的な研究は一部を除いて盛んではなかったことによる。しかし、ゲノム研究やそれから派生するツールを利用することにより、農業現場で問題となっている農業害虫に対して、有用な管理技術に繋がる研究が展開できることが、認識されつつある。ゲノム情報を整備し、ゲノムツールを充実させることにより、農業害虫の研究を飛躍的に進展させることが必要と思われる。例えば、圃場で害虫の薬剤感受性が低下した場合、その原因と対策を早急に決定することが必要である。一般に、薬剤感受性低下の大きな要因として、対象昆虫の代謝酵素活性の上昇による薬剤の早期

分解と薬剤の標的分子の変異による薬剤そのものの効力低下の二つが考えられる。。特定の薬剤に対する代謝酵素の遺伝子情報は、ゲノム情報から得られ、その酵素活性はmRNA量の多少によって推定できる。また、標的分子が特定されていれば、その塩基配列決定により変異が起こっているかどうか判断できる。また、殺虫剤開発から考えると、標的分子がまだ解明されていない殺虫剤の作用機構解明や、さらには特定の標的分子をねらった薬剤開発も可能と思われる（野田，2004）。その他に、作物の耐虫性と害虫との相互作用なども分子のレベルで解析されるようになれば、より信頼性の高い、効果的な防除を目指すことができる。ゲノム情報は半永久的に保存され利用できるもので、それにかけた投資は無駄にはならない。ゲノム配列情報を取得する際の方向性として、より高度なゲノムリソース整備を行うべきか、EST解析程度にとどめるべきかの判断が各害虫ごとに必要であろう。数年前ならば、農業害虫の全ゲノム解読はとても考えられなかったが、シーケンス費用が下がってきて、農業害虫のゲノム解読を目指す動きが世界的に盛んになってきている。モデル生物を中心とした重要な生物種のゲノム解析は一息つき、これまでに積み上げてきたシーケンス

パワーを農業害虫に当てることが可能になってきたこと、そして、次世代シーケンサーが普及してきて以前よりもゲノム解析のハードルが随分低くなってきたことも重要な要因である。特に、高性能なシーケンサーの開発には、今後目が離せなくなりつつある。そして、同時に大量に生産されるゲノム情報を扱うコンピューターパワーと情報処理ができる技術者（bioinformatician, bioinfomatist）の養成が重要になりつつある。

トビイロウンカのゲノム研究とその応用

農業害虫の典型的な例としてトビイロウンカのゲノム研究とその展開について、現状を紹介したい。カイコのEST解析と同様に組織ごとにcDNAライブラリーを作製し、クローンごとに5'側から一回配列決定を行い、データを蓄積した。この解析の特徴は、小さな組織からも簡易にcDNAライブラリーを作製できるように、少量のサンプルからPCRにより増幅し、TAクローニングを行っている点である。初期に作製したファージライブラリーに比べて遜色ないライブラリーが少量のサンプルから容易にできる。また、一つずつチャートを確認しているので、データのクオリティーは高いと考えられる。現在までの解析分（約37000 EST）は生物研のサイトに公開されている（図1）。トビイロウンカのESTライブラリーは組織別に作られているので、組織特異的に発現する遺伝子などを見つけることができる。実際、卵巣や精巣で特異的に発現している遺伝子が幾つか見つかっている（Noda et al., 2008）。ウンカで高発現している遺伝子の多くは、ハウスキーピング遺伝子であるが、発現量が高いにも係わらず、機能不明の新規遺伝子が幾つか見つかっており、その役割解明が課題である。EST解析データなどをもとに、ウンカではマイクロアレイが作られている。アジレント社製の44K x 4（スライドガラス上に44,000スポットのアレイが4個載っている）のオリゴマイクロアレイを現在使用している。マイクロアレイは、トビイロウンカで発現している遺伝子を組織別や発育ステージ別に調査したり、実験処理間で比較できるなど、強力な解析ツールである。現在、生物研ではオープンラボを開設して、カイコのマイクロアレイとともに、研究者に実験手法

も提供している (<http://www.nias.affrc.go.jp/openlabo2/index.html>)。トビイロウンカに感染する微生物の研究、吸汁と栄養代謝の研究、殺虫剤抵抗性と遺伝子発現解析など、マイクロアレイを用いて新しい取り組みが行われている。

The brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera, Delphacidae) causes severe sucking damage to rice plant. This planthopper is also a vector of rice virus diseases.

A list of partial cDNA sequences of the brown planthopper submitted to the public databases. The cDNAs are derived from various cDNA libraries constructed from different organs/tissues and developmental stages. The EST data can be accessed by key word, clone name or Gene Ontology.

Search Entries of TOBIROUNKA EST Database

Search Options			
Clone Name Keyword	<input type="text"/>		
Gene Ontology Keyword	<input type="text"/>		
Gene Ontology Selection	Biological Process	Molecular Function	Cellular Component
	<input type="text" value="not specified"/>	<input type="text" value="not specified"/>	<input type="text" value="not specified"/>
Homology Value	NCBI-NR	Drosophila	C.elegans
	<input type="text" value="not specified"/>	<input type="text" value="not specified"/>	<input type="text" value="not specified"/>
Homology Keyword	NCBI-NR	Drosophila	C.elegans
Target Sequences	<input checked="" type="radio"/> Representative <input type="radio"/> original (No Gene Ontology)		
Output Format Options			
Display items	<input checked="" type="checkbox"/> Gene Ontology <input checked="" type="checkbox"/> NCBI-NR homology <input checked="" type="checkbox"/> drosophila homology <input checked="" type="checkbox"/> C.elegans homology		
Sort Order	<input checked="" type="radio"/> ASC <input type="radio"/> DESC		
Number of output line	<input type="text" value="10"/>		

[notes] If you search without search option, all entries are displayed.

図1. トビイロウンカのESTデータベース (<http://bphest.dna.affrc.go.jp/>)

トビイロウンカに関しては、まだEST数が十分ではないと考えられ、完全長cDNA解読とともにさらに解読を進める必要がある。また、今後全ゲノム解読が容易に進められるように、BACライブラリーなどのリソースの整備が必要であると考えられる。これは、近い将来に予想される大量シーケンス時代に備える意味でも重要なことである。

イネゲノム・微生物ゲノム

今後の展開として、対象とする昆虫だけでなく、その昆虫の生息環境下にある他生物との相互作用の研究の重要性がますます高まると考えられる。実験室内で個々の昆虫を研究することも必要であるが、畑や圃場での実態に即した相互作用研究を行うことの必要性が考えられる。ゲノム研究が多くの生物に及ぶようになると、害虫と相互作用する生物のゲノム研究にも注目していかなければならない。ウンカに関しては、その寄主植物であるイネのゲノム解読がほぼ終わっており、イネのゲノム解析ツールが利用できる。ウンカの加害によるイネの影響をイネマイクロアレイを使って研究することもでき、トビイロウンカとイネの相互作用解析は一つのモデル研究になると思われる。また、ウンカ類からは寄生・共生する微生物

が多く見つかかり、それら微生物のゲノム解読も将来有望な研究展開に繋がると考えられる。共生微生物のゲノム解読は、昆虫の共生現象の理解を大きく進展させており (Moran, 2007; Moran et al., 2009)、共生微生物自体の利用だけでなく、宿主昆虫の発育制御に繋がる研究を期待したい。

総合的害虫管理を目指して

Integrated pest management (IPM, 総合的害虫管理) の考え方が出てきてすでに半世紀以上が経過し、IPMという言葉が盛んに使われ出して40年近くが経過している。殺虫剤だけに頼る防除ではなく、より有効な防除手段を組み合わせ、被害を回避するために、これまで多くの害虫種において、IPMを目指した研究が行われている。しかし、作物栽培が既存の害虫に脅かされる事態が十分改善されているとは言い難い。また、そのほかにも新興そして再興の害虫類が出現するという事態に陥っている。栽培体系や気象条件の変化が作物被害に与える影響も無視できない。これまでの害虫との「イタチごっこ」を少しでも改善し、より健全な作物栽培を目指すために、より新しい研究アプローチを模索し、現場でのニーズに応じていく必要がある。ゲノム研究は生物学に大きな変革をもたらした。害虫管理技術開発においても、そのポテンシャルを大いに活用する時期が到来している。

謝辞

本研究の遂行にご援助賜った、生物研の三田和英、長村吉晃、三菱スペースソフトウェアの下村道彦の各氏に謝意を表す。EST解析に関しては小泉蓉子さんと佐藤友紀さんに、マイクロアレイ解析に関しては中村有希さんに、遺伝子解析に関しては河合佐和子さんにお世話になった。また、農業生物資源研究所昆虫・微生物間相互作用研究ユニットならびに東京大学新領域創成科学研究科先端生命科学専攻応用生物資源学分野連携講座のメンバーに感謝する。

引用文献

- Adams, M. D. et al. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-2195. Holt, R. A. et al. (2002) The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 298, 129-149. International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921. 加納圭 (2008) ヒトゲノムマップ. 京都大学学術出版会, 401 pp.
- Mita, K. et al. (2003) The construction of an EST database for *Bombyx mori* and its application. *Proc Nat Acad Sci USA* 100, 14121-14126. Mita, K. et al. (2004) The Genome Sequence of Silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Res* 11, 27-35. Moran, N. A (2007) Symbiosis as an adaptive process and source of phenotypic complexity. *Proc Nat Acad Sci USA* 104, 8627-8633. Moran, N. A, McLaughlin, H. J., Sorek, R. (2009) The dynamics and time scale of ongoing genomic erosion in symbiotic bacteria. *Science* 232, 379-382. Nene, V. et al. (2007) Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science* 316, 1718-1723. 野田博明 (2004) ゲノム情報に基づく殺

虫剤開発：その展望と問題点. 日本農薬学会誌
29, 163-169.

Noda, H. et al. (2008) Annotated ESTs from various tissues of the brown
planthopper *Nilaparvata lugens*: A genomic resource for studying
agricultural pests. BMC Genomics 9, 117.

野田博明・三田和英 (2008) 昆虫ゲノム研究の現状と今後の展開 : Arthropod Genomics
Conferenceに出席して. 蚕糸・昆虫バイオテック 77, 131-138.

The honeybee genome sequencing consortium (2006) Insights into social insects
from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. Nature 443, 931-949.

The international silkworm genome consortium (2008) The genome of a lipidopteran
model insect, the silkworm *Bombyx mori*. Insect Biochem Mol Biol 38,

1036-1045. Tribolium genome sequencing consortium (2008) The genome of
the model beetle and pest : *Tribolium castaneum*. Nature 452, 949-955.

Venter, C. et al. (2001) The sequence of the human genome. Science 291, 1304-1351.

Xia, Q. et al. (2004) A Draft Sequence for the Genome of the Domesticated Silkworm
(*Bombyx mori*). Science 306, 1937-1940.

Yamamoto, K. et al. (2008) A Bac based integrated linkage map of the silkworm,
Bombyx mori. Genome Biol 9, R21

用語解説

BAC (bacterial artificial chromosome) : 細菌の人工染色体。100~200 kbくらいの大きなDNAを取り込むことができるので、ゲノムの断片をクローニングし、配列決定などに使用する。

cDNAライブラリー : 発現している遺伝子 (mRNA) を逆転写によりDNAにしてベクター (プラスミドやファージ) に入れたもの。目的の遺伝子を探索したり、遺伝子配列を調査するために作製する。

EST (expressed sequence tag) : cDNAライブラリーの中の遺伝子 (クローン) を一回だけ配列決定したもの。普通それぞれ数百塩基の配列が決定され、それらを集めてデータベース登録する。

NCBI (National Center for Biotechnology Information) : アメリカのNIH (National Institute of Health) が作ったNational Library of Medicineの一部門で、メリーランド州のベセスダに位置する。GenBankというデータベースに遺伝子情報を集積し、データを世界の研究者に提供している。

SNP (single nucleotide polymorphism) : スニップと呼ぶこともある。一塩基多型のこと。ゲノムの塩基配列で、個体などによって特定の1塩基が別の塩基に置き換わっている変異。

遺伝子地図 : 染色体上の遺伝子の位置を示した地図のこと。染色体地図。ゲノムプロジェクトを効率的に進めるために、マーカーの位置などを記入した地図を作る。ポジショナルクローニング (ゲノムの位置情報から目的の遺伝子を取得する) などにも有用である。

完全長cDNA：cDNAライブラリーのうち、mRNAの5' 端から3' 端までを含むクローンが入っているライブラリー。実際ゲノムから転写されてタンパク質に翻訳される部分を完全に含む。ゲノム配列上の転写開始点などの情報をより詳しく見るときに、有力な情報を提供する。

次世代シーケンサー：1解析で数十Mb以上の塩基配列を解読できる、高速シーケンサー。これまでのサンガー法とよばれる塩基配列決定法に代わって、種々の方法が提案されている。現在、3種類の次世代シーケンサーが使われている。さらに新しいシーケンサーが開発されるとともに、今後さらに性能が向上すると思われる。

総合的害虫管理（integrated pest management, IPM）：相補完する害虫防除技術を、矛盾することなく組み合わせて、害虫個体群を被害が起こらない密度以下（経済的被害許容水準以下）に維持する技術体系（防除戦略）

ハウスキーピング遺伝子：多くの組織や細胞中で一定量発現しており、一般に細胞の維持や増殖に係わっている分子の遺伝子。

マイクロアレイ：サンプル間での遺伝子の発現量を比較できる。各種の遺伝子断片（プローブと呼ぶ）をスライドガラス上に高密度に貼り付け、目的のサンプルの遺伝子を蛍光ラベルして、載せる。同じ遺伝子の配列（相補配列）があると、蛍光が検出され、存在する遺伝子の相対量が調査できる。

野菜害虫の IPM とゲノム研究

(独) 農研機構 野菜茶業研究所 野菜 IPM 研究チーム 本多健一郎

野菜の害虫防除を取り巻く状況

世界経済のグローバル化とともに、海外から侵入する害虫も増加している。近年日本に侵入した野菜の重要害虫としては、オンシツコナジラミ、ミナミキイロアザミウマ、ミカンキイロアザミウマ、シルバーリーフコナジラミ（タバココナジラミバイオタイプ B）、マメハモグリバエ、トマトハモグリバエ、アシグロハモグリバエ、トマトサビダニ、タバココナジラミバイオタイプ Q などが挙げられる。これらの中には、同種であっても性質の異なる系統が再度侵入している場合も含まれる（例：タバココナジラミのバイオタイプ Q）。

また国内での物流の発達に伴って、侵入した害虫の分布拡大速度も速く、初めて発生を確認した地点から急に飛び離れた地点に分布が拡大する場合も見られる。

これらの侵入害虫は殺虫剤に対する抵抗性を獲得している場合も多く、さらに加えて各種のウイルス病を媒介する害虫種もいる（コナジラミ類やアザミウマ類など）。

こうした難防除害虫の侵入と発生増加に伴って、殺虫剤のみに依存した病害虫防除はますます困難になって来ており、各種の防除法を合理的に組み合わせた総合的な病害虫管理（IPM）に取り組まないと、安定した野菜生産が困難になりつつある。こうした問題は、収穫可能になるまでの生育期間が比較的長く、しかも長期間栽培と収穫を継続する必要がある果菜類（トマト、ナス、ピーマンなど）で顕著である。

一方、消費者からは安全安心な農作物の生産と供給が求められている。農薬残留基準に関するポジティブリスト制度の導入により、他の農作物への散布に伴うドリフトなどによる未登録農薬の付着であっても、検出された場合には出荷物の全面回収や産地の公表など社会的に重要な問題となる危険性がある。

このように野菜の生産現場では、生産物の安全性を高めると同時に、海外から侵入した多くの難防除害虫の防除にも取り組まなければならないというジレンマに陥っている。

野菜害虫の防除に関する研究とゲノム情報

(1) 害虫種や系統の判別技術

これまで野菜茶業研究所では、オンシツコナジラミ、ミナミキイロアザミウマ、シルバーリーフコナジラミ（タバココナジラミバイオタイプ B）、トマトハモグリバエ、トマトサビダニ、タバココナジラミバイオタイプ Q などの難防除害虫を対象に、発生生態と防除技術に関する研究を行ってきた。

特に最近問題になっているタバココナジラミは、トマト黄化葉巻病などのウイルス病を高率で媒介し、殺虫剤抵抗性も発達させているため、野菜生産地での殺虫剤による防除が極めて困難である。タバココナジラミは形態的な特徴に乏しく、外部形態では区別できないが、寄主植物や生理生態が異なる 20 種類以上のバイオタイプが世界中に分布している。日本では 1989 年頃に侵入したバイオタイプ B、2004 年頃に侵入が確認されたバイオタイプ Q のほか、以前から日本列島に土着していた JpL、Nauru などの在来系統の存在が確認された。中東原産のバイオタイプ B は有機リン系殺虫剤や合成ピレスロイド系殺虫剤に対して抵抗性を発達させており、日本への侵入当初は有効な登録農薬が無いため防除に苦慮したが、ネオニコチノ

イド系殺虫剤やピリプロキシフェン（脱皮変態阻害剤）などの有効な農薬が登録されるにつれて、効果的に防除できるようになった。しかし、2004年頃からこうした殺虫剤による防除が困難なタバココナジラミ個体群が見いだされるようになり、遺伝子情報を解析した結果、新しいバイオタイプQの発生が確認された。バイオタイプQはイベリア半島原産で、バイオタイプBとは交雑せず、コナジラミ類に対する主要な防除薬剤であったネオニコチノイド系殺虫剤やピリプロキシフェンに対して抵抗性を発達させているため、生産者はその防除対策に苦慮している。

殺虫剤に対する感受性が大きく異なるバイオタイプの発生により、的確な防除対策を立てる必要性から、バイオタイプを判定する診断技術が必要となった。バイオタイプBとバイオタイプQは、ミトコンドリア遺伝子のC01領域の塩基配列に違いがあるため、塩基配列を読み取って比較すれば容易に判定できるが、高価な機器と試薬が必要である。

簡便なバイオタイプ判別法として、PCRで増幅されたミトコンドリアC01領域を制限酵素で切断し、得られたDNA断片を電気泳動したバンドパターンの違いによって判定するPCR-RFLP法が開発された（図）。さらに、複数のプライマーを使って同時にDNAを増幅させ、バンドパターンの違いにより判定するマルチプレックスPCR法も開発され、適切なプライマーとサーマルサイクラーがあれば、タバココナジラミのバイオタイプ判定は可能となってきた。

しかし、これらの手法を使っても国内に生息する全てのバイオタイプを同時に判定することはできず、殺虫剤抵抗性の程度については薬剤感受性検定試験を実施しないと判定できない。タバココナジラミの遺伝子解析によって、バイオタイプを簡便に判定するために適した遺伝子領域や、殺虫剤抵抗性の生理機構と密接に関連した遺伝子領域を特定し、それらの領域に特異的な判別プライマーを開発できれば、有効な診断技術に結びつくと考えている。

タバココナジラミ以外でも、形態的な特徴に乏しい微小昆虫では塩基配列の違いにより種や系統を判別する技術が遺伝子バーコードと呼ばれ、注目されている。遺伝子バーコードを活用すれば、成虫以外の発育ステージでも種や系統の判別が可能となるため、同定作業の迅速化と簡便化に結びつくことが期待される。遺伝子バーコードとして利用される遺伝子領域としては、ミトコンドリアC01領域やリボソーム遺伝子のITS領域などが一般的であるが、生物グループによってはこれらの領域の変異性が乏しく、種や系統の判別に利用できない場合もある。どのような遺伝子領域が種や系統の判別に適しているのかを明示できる統一的な理論が求められている。

(2) 天敵捕食者の餌メニュー解析技術

露地での野菜生産では、土着の天敵を有効に活用して害虫の多発生を防止しようという試みが広く行われている。ナスやピーマンの産地では、圃場の周囲をソルゴーのような障壁作物で囲い、防風効果とともに土着天敵の定着・増殖場所として活用している。こうした技術を普及するためには、障壁作物でどのような天敵が定着・増殖し、実際に作物害虫の密度低下に貢献しているかどうかを定量的に評価する必要がある。

捕食性天敵の餌メニューを解析する技術として、かつては免疫的な手法が利用されたが、近年は餌となる生物に特異的なプライマーを使って、捕食者の消化管内容物から捕食された生物種を特定する研究が進められている。

これまでにテントウムシやクサカゲロウ、オサムシ、クモなどの中腸で餌種の特異的プライマーを使用した検出結果が報告されており、捕食後一定の時間内であれば検出可能である

とされている。特異的プライマーを使った餌メニューの検出技術が広く活用されれば、野外の圃場でどの捕食者が目標となる害虫を実際に捕食しているかが明らかになり、圃場環境を管理して天敵捕食者の定着と増殖を図る上で有益な情報が得られると思われる。

(3) ウイルス媒介能力の評価技術

タバココナジラミやアザミウマ類は重要な植物ウイルス病を永続的に媒介するため、害虫自身による食害よりもウイルス媒介による被害の方が深刻である場合も多い。タバココナジラミは循環型・非増殖型の様式でトマト黄化葉巻病の病原ウイルス (TYLCV) を媒介するが、媒介プロセスが成立するためには中腸から血体腔へのウイルスの取り込み、血体腔でのウイルス循環と唾液腺組織へのウイルスの取り込みという、二つの障壁を通過しなければならない。媒介されるウイルス (TYLCV) とタバココナジラミの中腸壁、唾液腺組織の間には特異的な親和性が存在し、ウイルスはこれらの組織細胞に取り込まれて内部に運ばれると考えられている。ウイルスの遺伝子には媒介虫の組織との親和性をコードする領域が知られており、逆に媒介虫側にも対応する遺伝子領域が存在すると考えられる。

ミカンキイロアザミウマはトマト黄化えそ病の病原ウイルス (TSWV) を循環型・増殖型の様式で媒介するが、ウイルスは媒介虫の中腸組織で感染増殖し、唾液腺を経て植物に媒介される。この場合も媒介虫の組織細胞とウイルスの間には特異的な親和性が存在する。昆虫によるウイルスの永続的媒介では、両者間の媒介親和性に変異のあることも知られており、昆虫個体群によって、媒介効率の高い個体群とそうでないものが存在する。媒介親和性の分子メカニズムはまだ十分に解明されていないが、媒介虫の側で遺伝的な変異に基づくウイルス媒介性の違いが存在する可能性がある。ウイルス媒介性に関連した遺伝子領域と、その変異による媒介能力の変化のメカニズムを解明できれば、媒介虫個体群のウイルス媒介リスクを評価することができるとともに、媒介能力を制御することも可能になるかも知れない。

今後の展望

昆虫におけるゲノム解析の進展によって、これまで分類が困難であった系統間の判別や成虫以外の発育ステージでの分類同定が可能となってきた。遺伝子情報を利用した分類同定技術をさらに発展させるためには、様々な昆虫種・グループでの遺伝子情報の蓄積が必要であり、基礎的なデータをどのように効率的にデータベース化していくかが課題であろう。

捕食性天敵の餌メニューを解析するためには、目的とする餌種の特異的プライマーの開発と捕食者からの検出実験を繰り返す必要がある。近年、PCR による検出技術が発展しているため、こうした技術を活用して食うものと食われるものの解析が分子レベルで進むことを期待したい。

ウイルス媒介の分子機構が明らかになり、ウイルス媒介能力に関わる媒介虫の遺伝子領域が判明すれば、これまでブラックボックスであった媒介虫体内でのウイルスの挙動が把握可能になるとともに、ウイルス媒介そのものを阻害する新しい防除技術の開発にもつながる可能性がある。

カイコにおいて進展したゲノム解析の成果を他の多くの昆虫種、特に難防除害虫に対して適切に応用し、新しい防除技術に結びつけるためには、害虫防除に取り組む研究者とゲノム研究者の定期的な交流と情報交換が重要であろう。

PCR-RFLP

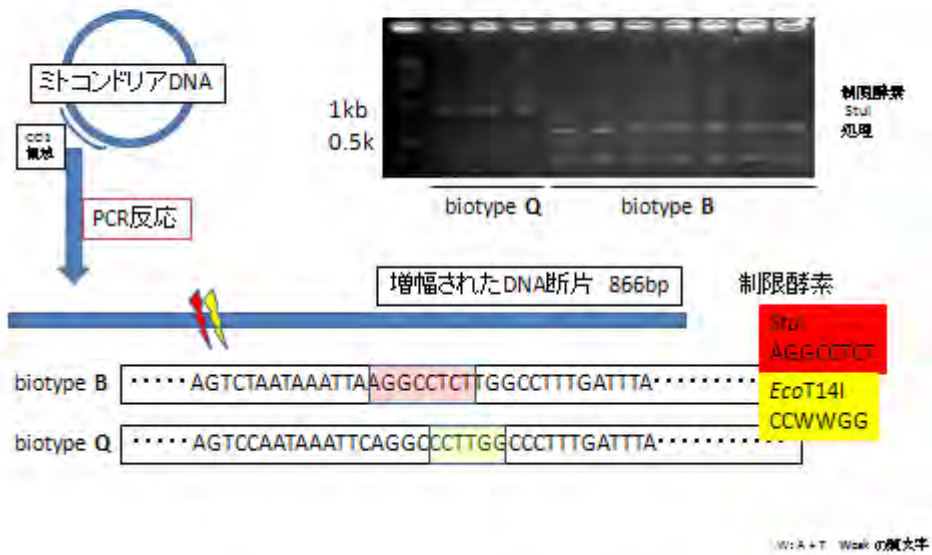


図 タバココナジラミバイオタイプ B と Q の PCR-RFLP による判別法模式図
革新的農業技術取得研修テキスト (2008)。上田 (2005) の報告を元に北村作図。

ゲノム研究と天敵利用

農業生物資源研究所
昆虫-昆虫・植物間相互作用研究ユニット
日本 典秀

農業害虫防除に用いられる天敵には、捕食性天敵と捕食寄生性天敵がある。この他にもウイルスや糸状菌など微生物も天敵であるが、本講演では天敵昆虫類に限定する。

これまでに多くの昆虫種のゲノム解読が開始、進行中であるが、天敵昆虫とされる種はキョウソヤドリコバチ *Nasonia vitripennis* およびその近縁 2 種のみである(野田・三田, 2008)。キョウソヤドリコバチはキンバエやニクバエなどのハエ類の寄生バチであり、寄主の蛹に産卵する。本種は、家畜の糞などにたかるハエの生物的防除にも利用されており、米国 NIH が本種のゲノムプロジェクトを支援する理由の一つでもあるが、ゲノム研究の目的は、むしろ多様な生活史戦略、とくに性決定機構の進化的理解を深めるためといえよう。

したがって、農業害虫の生物的防除に利用される天敵昆虫類のゲノム研究は、まったくといっていいほど、手がつけられていない。

そもそも、非モデル昆虫種で DNA 分析が普及してきたのは、既知の塩基配列情報を必要としない RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Welsh&McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990) が普及し、また、多くの昆虫種のミトコンドリア DNA を増幅できるプライマー情報が提供 (Simon *et al.*, 1994) されてからである。これらの情報を用いた DNA 多型は、DNA マーカーとして、種の識別、系統の識別などに利用されてきた (Behura, 2006; Gariepy *et al.*, 2007; Greenstone, 2006)。天敵利用の場面でも DNA マーカーとしての利用が一般的であるので、まずはじめに、このあたりを紹介していきたい。

天敵利用には大きく分けて、生物農薬的利用 (放飼増強法)、土着天敵の保護利用、導入天敵の永続的利用 (伝統的生物的防除)、の 3 種類がある。

生物農薬的利用は、施設栽培など的人為的環境で天敵がそもそも存在しない場合や、露地栽培であっても土着天敵が少なく効果が得られない場合に、大量増殖した天敵を人為的に放飼して害虫を防除するものである。生物農薬的に天敵を利用する場合は基本的に農薬登録が必要である。最も販売額が大きいのが、アザミウマの捕食性天敵であるタイリクヒメハナカメムシ *Orius strigicollis* やククメリスカブリダニ *Neoseiulus cucumeris*、ハダニなどの捕食性天敵であるチリカブリダニ *Phytoseiulus persimilis* やミヤコカブリダニ *Neoseiulus californicus*、コナジラミの寄生バチであるオンシツツヤコバチ *Encarsia formosa*、アブラムシの寄生バチであるコレマンアブラバチ *Aphidius colemani* などである。

生物農薬的利用で問題となるのは、大量増殖が不可欠であるという点である。室内で累代飼育した系統は、遺伝的浮動やボトルネック効果、さらには室内環境への適応によって、もとの集団から形質が変化してしまったり、近親交配を繰り返すために近交弱勢が起こってし

まったりする懸念がある(Bigler, 1989; Leppla&Ashley, 1989)。従来は、増殖率・行動など天敵として重要な形質をそれぞれ測定して評価していたが、作業が煩雑なため効率化が望まれている。DNA マーカーを利用した多型調査が一般的になれば、遺伝的浮動や近交弱勢は容易に検出可能になる。さらに、ゲノム情報が蓄積され有用形質そのものの遺伝子が得られれば、その遺伝子をモニターすることで品質管理が容易に行えるようになるだろう。

さらに、生物農薬で利用される天敵には、非休眠性や薬剤抵抗性と言った有用形質が育種・選抜で付与されることもある。しかし、生物農薬は放飼後に増殖して効果を発揮するものであるから、こうした優良系統を入手すれば、他社でも増殖は簡単である。DNA マーカーを用いれば、こうした“海賊版”を検出することも可能になり、育成者の権利保護にもつながる。

土着天敵の保護利用は、近年見直されてきている天敵の利用法である。もともと、野外生態系には害虫の天敵となるような種がたくさん存在するのだが、農業生態系では化学農薬の散布によって排除されてしまうため、結果的に天敵が見つからないことが多い。しかし、近年の減農薬や選択性の高い農薬の利用によって、これまで見られなかった天敵が多く見つかるようになってきた。

捕食性天敵の多くは餌範囲が広い多食性(広食性)であり、ターゲットとなる害虫を実際に有効に捕食している天敵種を見極めるのは難しい。しかし近年、害虫種特異的な DNA マーカーを用い、捕食性天敵から餌種を検出する試みが現れてきた(Greenstone, 2003; Harper *et al.*, 2005; Hoogendoorn&Heimpel, 2001; Symondson, 2002)。害虫種特異的なマーカーが充実してくれば、こうした検出も信頼性を増し、保護すべき天敵が容易に判断可能になるであろう。

寄生性天敵は、通常は寄生された害虫種を室内に確保して羽化を待てば天敵種の同定は可能であり、ある害虫種に寄生する天敵種を特定するのはさほど困難ではない。しかし、有効利用のためには、圃場全体での寄生率を評価しなくてはならないが、これも、種の識別マーカーが得られれば、容易に行える(Greenstone, 2006; MacDonald&Loxdale, 2004)。

導入天敵の永続的利用は、通常、国内に定着した侵入害虫に対して、その起源地から天敵を導入することで行われる。害虫種も、その起源地では天敵により密度が抑えられており、大問題とはならないことが多いので、その地で天敵を探索することが重要である。害虫の侵入経路を特定するには、やはり分子マーカーを用いた経路推定が必要となる。起源地が分かった場合も、その地で害虫を抑えているのがどの種であるのか知る必要があり、それには上述の土着天敵の保護利用と同じ手法での対処が可能である。

DNA マーカーとして、種や系統の識別には、ミトコンドリア DNA や核リボソーム RNA 遺伝子などが用いられることが多い。ミトコンドリア COI 遺伝子の一部の塩基配列をもちいてあらゆる動物種を識別しようという DNA バーコード法(Hebert *et al.*, 2003)の試みも、カナダを中心に普及してきている(Ratnasingham&Hebert, 2007)。また、移動分散などの解析には、マイクロサテライトなど、より種内多型の多い領域が利用される。いずれにしても、着目する形質に関わる遺伝子そのものではなく、形質が違う系統でそれぞれが持つ中立的なマーカーにたまたま違いがあっただけのものを利用しているにすぎない。

今後は、天敵としての有用形質そのものを把握しておく必要があるだろう。しかし、多種多様な害虫種・天敵種のゲノムを読むのは、いかに次世代シーケンサーが普及しつつあると

言っても、まだまだ先の話であろう。このような場合、たとえば、寄生バチはハチ目なので、キョウソヤドリコバチや、すでにゲノム解読が完了したミツバチ *Apis mellifera* のゲノムが利用できるかもしれない。ヒメハナカメムシは、オオサシガメの一種 *Rhodnius prolixus* と同じカメムシ目なので、これが利用できるかもしれない。様々な分類群での代表種のゲノム情報が得られれば、既知のゲノム情報から、目的の遺伝子を取ってくることも容易になるだろう。ゲノム解読までは必要ない場合も、分子生態学的アプローチが必須になってきている現在、EST 解析が有効である (Bouck&Vision, 2007)。有望な天敵種では、EST ライブラリの構築を進めることで、より効率的な天敵利用への道筋を付けられるのではないか。このようなゲノムレベルでの理解を現在得られている知見にプラスアルファすることで、進展が見られそうな例を以下にあげたい。

害虫が植物を加害すると、植物が防御反応を起こした際に発する揮発性化学物質 (herbivore-induced plant volatiles; HIPV) に天敵が誘引される (Sabelis&Baan, 1983) という天敵-植食者-植物の三者系は、議論はあるものの、一般によく知られる現象となっている (塩尻ら, 2002)。植物側の遺伝子レベルでの解明は進んできているものの (Arimura *et al.*, 2000; Shiojiri *et al.*, 2006)、天敵側では全くといっていいほど、進んでいない。これら HIPV の受容機構が分子レベルで解明できれば、どんな匂い物質が天敵を誘引しやすいかを効率的に解明でき、天敵を誘引しやすい匂い物質を生産させる作物品種の育成が可能になる。フェロモンなどの受容機構に関する分子メカニズムが、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* やカイコ *Bombyx mori* などでゲノム情報を用いて明らかになってきている (Nakagawa *et al.*, 2005; Robertson *et al.*, 2003; Sakurai *et al.*, 2004)。天敵ゲノム情報の解析が進展すれば、天敵の寄主探索の分子機構を明らかにできるだろう。

寄生性天敵は、寄主となる害虫に卵を産み付け、寄主体液を消化して成長する。寄主体内で成長する内部寄生性の天敵には、寄主の持つ生体防御反応を回避する機構が備わっている。たとえば、ポリドナウイルスを持つ寄生バチは、毒液とポリドナウイルスを寄主体内に注入し、寄主の血球がポリドナウイルスに感染すると、毒液に包まれた寄生バチの卵は、血球から守られる (Edson *et al.*, 1981)。この仕組みの分子レベルでの解明はまだ行われていない。生物間相互作用の分子レベルの解明と、天敵を利用した害虫防除が結びつく良い例であるため、寄主・寄生バチ双方のゲノムレベルでの研究が望まれる。

今後の天敵利用における遺伝子工学的手法としては、トランスジェニック天敵の試みもある。ハダニの捕食性天敵であるカブリダニの一種 *Metaseiulus occidentalis* で形質転換の成功例があり (Presnail&Hoy, 1992)、組換え遺伝子は 100 世代以上わたり保持されていた (Presnail *et al.*, 1997)。彼女らはガイドラインを作成した上で、野外放飼実験を行った (Hoy, 2000)。もちろん、害虫防除の場面で実際にトランスジェニック天敵を放飼するのは、まだまだ安全性の確保などの課題が残る。しかし、不妊虫放飼法のような方法を取り入れることで、技術的には対応可能であろう。むしろ問題は、どんな遺伝子を導入するかという点にある。組換え技術だけではなく、遺伝子情報、発現解析などを通じた、より深い理解のために、天敵のゲノム情報が求められる。

以上のように、DNA マーカーを用いた天敵の評価は、マーカーさえ作成できれば、現時点

でも十分利用可能な技術である。マーカー開発そのものも、さほど困難なものではない。ただ、対象種が多いため、かかわる研究者数がボトルネックとなっている。一方、機能遺伝子そのものの単離・解明は、まだまだこれからの分野であろう。リファレンスとなるモデル昆虫種でのゲノム解読が進めば、多種多様な害虫・天敵種の遺伝子単離が容易になり、天敵利用の効率的発展につながれると期待できる。

- Arimura G-I, Ozawa R, Shimoda T, Nishioka T, Boland W, Takabayashi J (2000) Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature* 406, 512-515.
- Behura SK (2006) Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. *Mol. Ecol.* 15, 3087-3113.
- Bigler F (1989) Quality assessment and control in entomophagous insects used for biological control. *J. Appl. Entomol.* 108, 390-400.
- Bouck AMY, Vision T (2007) The molecular ecologist's guide to expressed sequence tags. *Mol. Ecol.* 16, 907-924.
- Edson K, Vinson S, Stoltz D, Summers M (1981) Virus in a parasitoid wasp: suppression of the cellular immune response in the parasitoid's host. *Science* 211, 582-583.
- Gariepy TD, Kuhlmann U, Gillott C, Erlandson M (2007) Parasitoids, predators and PCR: the use of diagnostic molecular markers in biological control of Arthropods. *J. Appl. Entomol.* 131, 225-240.
- Greenstone MH (2003) Spider predation: Species-specific identification of gut contents by polymerase chain reaction. *Journal of Arachnology* 31, 131-134.
- Greenstone MH (2006) Molecular methods for assessing insect parasitism. *Bull. Entomol. Res.* 96, 1-13.
- Harper G, King R, Dodd C, Harwood J, Glen D, Bruford M, Symondson W (2005) Rapid screening of invertebrate predators for multiple prey DNA targets. *Mol. Ecol.* 14, 819-827.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.* 270, 313-321.
- Hoogendoorn M, Heimpel GE (2001) PCR-based gut content analysis of insect predators: using ribosomal ITS-1 fragments from prey to estimate predation frequency. *Mol. Ecol.* 10, 2059-2067.
- Hoy MA (2000) Transgenic arthropods for pest management programs: risks and realities. *Exp. Appl. Acarol.* 24, 463-495.
- Leppla NC, Ashley TR (1989) Quality control in insect mass production: a review and model. *Bulletin of the Entomological Society of America* 35, 33-44.
- MacDonald C, Loxdale HD (2004) Molecular markers to study population structure and dynamics in beneficial insects (predators and parasitoids). *Int. J. Pest Manage.* 50, 215-224.
- Nakagawa T, Sakurai T, Nishioka T, Touhara K (2005) Insect sex-pheromone signals mediated by specific combinations of olfactory receptors. *Science* 307, 1638-1642.
- 野田博明, 三田和英 (2008) 昆虫ゲノム研究の現状と今後の展開 : Arthropod Genomics Conference に出席して. *蚕糸・昆虫バイオテック* 77, 131-138.
- Presnail JK, Hoy MA (1992) Stable genetic transformation of a beneficial arthropod,

- Metaseiulus occidentalis* (Acari: Phytoseiidae), by a microinjection technique. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7732-7736.
- Presnail JK, Jeyaprakash A, Li J, Hoy MA (1997) Genetic analysis of four lines of *Metaseiulus occidentalis* (Acari: Phytoseiidae) transformed by maternal microinjection. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 90, 237-.
- Ratnasingham S, Hebert PDN (2007) BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Mol. Ecol. Notes* 7, 355-364.
- Robertson HM, Warr CG, Carlson JR (2003) Molecular evolution of the insect chemoreceptor gene superfamily in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 14537-14542.
- Sabelis MW, Baan HEvd (1983) Location of distant spider mite colonies by phytoseiid predators: demonstration of specific kairomones emitted by *Tetranychus urticae* and *Panonychus ulmi*. *Entomol. Exp. Appl.* 1983, 303-314.
- Sakurai T, Nakagawa T, Mitsuno H, Mori H, Endo Y, Tanoue S, Yasukochi Y, Touhara K, Nishioka T (2004) Identification and functional characterization of a sex pheromone receptor in the silkworm *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 16653-16658.
- Shiojiri K, Kishimoto K, Ozawa R, Kugimiya S, Urashimo S, Arimura G, Horiuchi J, Nishioka T, Matsui K, Takabayashi J (2006) Changing green leaf volatile biosynthesis in plants: An approach for improving plant resistance against both herbivores and pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 16672-16676.
- 塩尻かおり, 前田太郎, 有村源一郎, 小澤理香, 下田武志, 高林純示 (2002) 植物-植食者-天敵相互作用系における植物情報化学物質の機能. *応動昆* 46, 117-133.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a comparison of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87, 651-701.
- Symondson WOC (2002) Molecular identification of prey in predator diets. *Mol. Ecol.* 11, 627-641.
- Welsh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic. Acids Reseach* 18, 7213-7218.
- Williams JGK, Kuberik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic. Acids Reseach* 18, 6531-6536.

耐虫性の作物品種を利用した害虫防除

農業生物資源研究所 田村泰盛

<はじめに>

近年国内外において、残留農薬など食品の安全性に対する意識・関心が高まってきている。農薬使用量の低減などにより環境負荷や生態系への影響を少なくし、安全性の高い農産物を提供する「環境保全型農業」への取組強化が喫緊の課題となっている。環境保全型農業の実現には、農薬に依存しない様々な害虫防除手段の開発が必要であり、IPM の技術の一つとして、害虫に強い作物品種を用いた防除にも期待が寄せられている。

植食性昆虫の食害に対し、植物は進化の過程で様々な防御機構を発達させてきたことが近年の研究で明らかにされてきている。葉の表面に存在する突起物（トライコーム）の中には、植食性昆虫の食害に対して物理的な防御効果があると考えられている例がある。また、アルカロイドや青酸配糖体、プロテアーゼなど、植食性昆虫にとって毒性の高い2次代謝産物やタンパク質を葉に蓄えて植食性昆虫に対抗する例が知られている。さらに、虫の加害の際に栄養素を分解して餌としての栄養価を下げる植物や、栄養吸収を妨げるために昆虫の消化酵素の阻害剤を生産する植物も知られている(今野, 2007)。

生産性の高い多肥料栽培に適した多くの栽培作物の品種は、本来野生の植物が供え持つ昆虫に対する防御機能が失われており、昆虫の食害を受けやすいものが多い。植物が昆虫の食害を回避するために進化・発達させてきた防御戦略を研究し、人が食べた際の人体への安全性を検証した上で、これらの防御機構を積極的に活用した作物品種を開発することにより、減農薬や低農薬の農業が可能になると期待される。

<耐虫性作物の現状>

耐虫性の作物品種を用いた害虫防除は現状では国内であまり普及しているとはいえない。その原因として、まず、耐虫性の作物品種を遺伝資源の中から組織的に探査する努力があまりなされていないために、作出可能な耐虫性作物の候補が限られているという問題が挙げられる。また、耐虫性作物の遺伝資源があったとしても、従来 of 交配による育種では、耐虫性系統に良食味品種を戻し交配しても、耐虫性系統由来の不良形質を完全に排除する事が難しく、食味・外観・栽培特性等で品質の悪化がもたらされてしまうこと、さらに、単一の抵抗性遺伝子を導入した品種を育成しても、それを連続的に栽培することで、抵抗性品種を加害する害虫の系統（バイオタイプ）が出現し、抵抗性が崩壊してしまう可能性が懸念されることなどが挙げられる。これらの問題を解決するためには、耐虫性作物を遺伝資源からスクリーニングして耐虫性作物の候補を増やす努力が必要であり、また、良食味等の有用形質を損なわずに害虫抵抗性を導入するための技術開発や、バイオタイプの出現機構を解明し、バイオタイプを出現させない栽培方法を開発する必要がある。

イネでは害虫に抵抗性を示す遺伝資源の探査が、フィリピンにある国際イネ研究所 (IRRI: International Rice Research Institute) を中心に、国内外の大学・研究機関などで精力的に行われてきた。また、公開されているイネのゲノム情報を用いる事で DNA マーカーが容易に作成できるため、品種育成時に、抵抗性の親由来の染色体断片がゲノム上のどの部分にどの程度残っているかを、DNA マーカーで確認しながら戻し交配を進めることができ (DNA マーカー育種)、不良形質を完全に排除した抵抗性品種を効率よく育成することが可能となってい

る。次にイネの害虫抵抗性品種の研究事例を我々の研究を例に紹介する。

<イネにおける害虫抵抗性品種>

イネの害虫抵抗性に関する遺伝研究は、吸汁性昆虫ではトビイロウンカ・セジロウンカ等のウンカ類やツマグロヨコバイ・タイワンツマグロヨコバイ・イナズマヨコバイ等のヨコバイ類で、咀嚼性昆虫ではメイチュウやイネノシントメタマバエ等で行われている（金田，1990）。このうち国内では特にツマグロヨコバイ、トビイロウンカ、セジロウンカが重要害虫として知られており、これらの害虫に対する現行の防除法として、箱処理剤や仕上げ剤などの殺虫剤が施用されており、抵抗性品種の開発により、稲作における農薬散布量の低減が期待される。

<インド型イネ品種 Nona Bokra の保有するツマグロヨコバイ抵抗性の利用>

ツマグロヨコバイはイネに対し直接の吸汁害をもたらす他、萎縮病、矮化病などのウイルス病やファイトプラズマを媒介することで間接害をもたらす。抵抗性の遺伝分析は、幾つかの抵抗性品種について国内で行われている（安井，2007）。我々はインド型イネ品種の Nona Bokra がツマグロヨコバイ抵抗性を保有することを明らかにした。コシヒカリの遺伝的背景で、染色体が1本ずつ Nona Bokra の染色体に置き換わった染色体置換系統群を用いて抵抗性の検定を行ったところ、第5染色体が Nona Bokra に置き換わった系統だけがツマグロヨコバイ抵抗性を保持していた。そこで、約 5,000 個体の分離集団を用いて連鎖解析を行い、ツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子が座乗する候補領域を、Nona Bokra の第5染色体上の約 31 kb の範囲に絞り込んだ。この領域に存在すると予測される抵抗性遺伝子の詳細については現在解析中である。一方、この過程で得られた材料をもとに、コシヒカリの遺伝的背景で、抵抗性遺伝子の候補領域を含んだごく短い領域のみが Nona Bokra の染色体に置換した同質遺伝子系統を、DNA マーカー育種法により現在作出している。これにより、遺伝子組換え技術を使わなくても、味や栽培特性がコシヒカリと同一で、ツマグロヨコバイ抵抗性を保有する品種が育成できると期待される。

近年、イネにおいては相同組換えを用いて目的の遺伝子の配列を変換させる、ジーンターゲット法が開発が進められている。従来、高等植物では相同組換えの頻度が低いために、ジーンターゲット法は困難であるとされてきたが、イネでもジーンターゲット法の成功例が報告されてきている（Terada et al., 2002; Endo et al., 2007）。将来的には、ジーンターゲット法の手法を用い、インド型イネや野生イネの害虫抵抗性遺伝子を国内の現品種の対応する遺伝子と入れ替えることで、現品種に害虫抵抗性を保有させることが可能になるかもしれない。

<害虫抵抗性品種と加害性バイオタイプの出現>

IRRI では過去に、トビイロウンカ抵抗性遺伝子を導入した実用品種（IR26）を育成・普及させたが、2年で抵抗性を打破するバイオタイプが出現して抵抗性が崩壊する事態が生じた。東南アジアではイネは周年連続栽培されており、トビイロウンカは年10～12世代を繰り返すと考えられている（寒川，1981）。トビイロウンカは単食性であり、イネのみを餌とする。栽培イネがすべて抵抗性品種に置き換わったために、イネ以外の寄主植物を利用できないトビイロウンカに高い淘汰圧が生じ、集団に極わずかに含まれていた加害性バイオタイプが適応して生き残り、世代を重ねることで優先的に増殖したものであると予想されるが、バイオタ

イプが持つ変異等に関する詳細な情報はまだ分かっていない。

ツマグロヨコバイに対する幾つかの抵抗性遺伝子についても、単一主働遺伝子を導入した場合に加害性のバイオタイプが出現することが室内実験で確かめられている(平江, 2002)。現在、実験室で作出された加害性のバイオタイプを用い、バイオタイプで生じている変異をタンパク質や遺伝子レベルで特定する試みがなされている。ツマグロヨコバイやトビイロウンカではEST情報が整備され(Noda et al., 2008)、遺伝子の機能解析に必要なRNAiを用いた遺伝子発現制御技術などが確立されつつある。両種ともにまだゲノム解読は行われていないが、近年の次世代シーケンサーの進歩を考えると、近い将来これらのゲノムシーケンスを得ることも可能になると予測される。ゲノムシーケンスと物理地図の対応づけができれば、バイオタイプの変異をマップベースクローニングで特定することも可能になるだろう。これらの情報・手法を駆使し、バイオタイプの変異を特定する研究をさらに加速・推進する必要がある。

<加害性バイオタイプ出現を防ぐ栽培方法の検討>

植物の病害の分野では、抵抗性品種と感受性品種など、いくつかの品種を混植栽培することが抵抗性の崩壊防止に有効であることが知られている。イネの重要病害であるイネいもち病でも、抵抗性品種に現品種を何度も戻し交配し、農業上の実用形質は現品種と同質で、異なる真性抵抗性を持つ系統(同質遺伝子系統)を複数系統作成しておき、これを一定の比率で混合し(マルチライン)、混植栽培することで抵抗性の崩壊を防止する試みがなされている。新潟県では2005年に栽培面積約9万haに及ぶ従来のコシヒカリを、全県一斉にコシヒカリ・マルチラインに切り替え、減農薬栽培に成功している(堀 & 石川, 2008)。イネの病害と虫害の抵抗性のメカニズムは異なるが、害虫抵抗性の分野でも、マルチラインを作成することで、バイオタイプ出現を阻止できないかどうか検討する必要がある。

トビイロウンカとは異なり、ツマグロヨコバイは狭食性で、イネだけでなく幾つかの他のイネ科植物も寄主として利用できる。現在開発中のツマグロヨコバイ抵抗性品種を広範囲に栽培した場合、ツマグロヨコバイはイネ以外のイネ科植物に移動して生息することができるため、IR26でのトビイロウンカの例ほど強い淘汰圧がかからず、バイオタイプは出現しにくいと予想される。しかし、ツマグロヨコバイは国内で越冬できるため、野外の集団の中に抵抗性品種に適応したバイオタイプが存在すると、何世代もかけて個体数の割合を徐々に増加させる可能性は否定できない。抵抗性品種の使用に当たっては、バイオタイプ出現を見越して、抵抗性品種にどの程度感受性品種を混植するとバイオタイプ出現の抑制効果が高いのか等、栽培条件を検証する必要があると思われる。ツマグロヨコバイの抵抗性遺伝子はNona Bokra由来の抵抗性遺伝子以外に6種類(*Grh1*~*Grh6*)知られており、それぞれ座乗染色体が明らかになっている(安井, 2007)。また、*Grh1*を保有する「彩の夢」や*Grh3*を保有する「大地の風」等の実用品種が育成され普及に移されている他、*Grh2*と*Grh4*を保有する系統(佐系ツマ23Dなど)や、*Grh1*~*Grh4*をそれぞれキヌヒカリ導入した系統も作出されている(平江, 2002)。このような多種の抵抗性の遺伝子源を有効に活用し、異なる抵抗性遺伝子が導入された系統を混植栽培したり、抵抗性品種を数年おきに入れ替えて栽培したり、また、一つの品種に複数の抵抗性遺伝子を集積(ピラミディング)することで、持続的にツマグロヨコバイの発生を抑制する効果をさらに高められるかもしれない。

トビイロウンカに対し抵抗性を示すイネ品種も複数知られており、国内では*Oryza officinalis*由来のトビイロウンカ抵抗性遺伝子*bph11(t)*をDNAマーカー育種によりヒノヒ

カリに取り入れた関東 BPH1 号が育成された (平林, 2006)。トビイロウンカは国内では越冬できず、毎年梅雨時に海外から飛来により侵入する。*bph11(t)* 遺伝子はトビイロウンカの飛来源である東南アジアや中国南部で育種に使われていない抵抗性遺伝子であり、海外から飛来する集団は *bph11(t)* の加害能を持っていない。*bph11(t)* を加害できる個体が飛来集団に極わずかに含まれていたとしても、越冬できずに死亡するため、被害を及ぼすほど個体密度を上昇させることがないと考えられる。よって、国内においては、飛来源である東南アジアや中国南部で使用されていない抵抗性遺伝子を持つ品種を使用すれば、バイオタイプ出現の心配なく持続的に低農薬の農業を維持できると期待される。このように、トビイロウンカとツマグロヨコバイでは、同じイネの吸汁性害虫ではあるが、抵抗性品種を活用して防除する場合、対処する戦略が異なる。害虫種それぞれの生理・生活史を研究し、それぞれの種に合わせた防除戦略を立てることが肝要である。

<害虫抵抗性のメカニズムの研究>

害虫抵抗性品種を人が食べる際の安全性を評価する上で、また信頼性が高く効率のよい防除を実現するために、抵抗性のメカニズムを分子レベルで明らかにする事は極めて重要である。吸汁性昆虫に対する抵抗性遺伝子を保有するほとんどのインド型イネ品種は人間の食経験があり、安全性に問題はないと考えられるが、抵抗性のメカニズムはまだ明らかにされていない。電氣的測定装置を用いたツマグロヨコバイの吸汁行動測定の結果、Nona Bokra の抵抗性は、師部組織で発現していることが明らかになった。抵抗性の原因として、師管液に摂食阻害物質が含まれている可能性や、師管閉塞による吸汁阻害の可能性が考えられる (服部, 2006)。ツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子 *Grh2* と *Grh4* を保有するインド型イネ品種 *Lepe dumai* では、師管液を分取してツマグロヨコバイに与えたところ、問題なく吸汁したことから、師管液に摂食阻害物質等が存在する可能性は低いと考えられている (Kawabe, 1985; Hattori, 1997)。現在、Nona Bokra の師管液中でツマグロヨコバイの加害により発現量が増える遺伝子をイネのマイクロアレイにより解析し、防御関連遺伝子の候補を選定中である。また、ツマグロヨコバイとトビイロウンカの吸汁に係わる唾液タンパク質が分析されており、イネと虫のそれぞれの相互作用に関わる因子を分子レベルで解析することで、抵抗性のメカニズムを明らかにする糸口が得られるものと期待される。イネと吸汁性昆虫の相互作用研究から得られる成果は、他の吸汁性害虫であるアブラムシと作物との相互作用研究にも有用な知見となり、波及効果は大きいと期待される。

アメリカ合衆国ではコムギの害虫であるヘシアンバエの防除に抵抗性品種が使用されたが、これらの抵抗性品種についても加害性バイオタイプが出現している (Harris et al., 2003)。この重要害虫であるヘシアンバエは、オス成虫を対象にしてゲノム解析が始まっている (野田 & 三田, 2008)。部分的なゲノム情報を利用して、ヘシアンバエのバイオタイプの変異をマップベースクローニングで特定する研究も既に進行している (Lobo et al., 2006)。バイオタイプの変異が分かれば、バイオタイプ出現を抑制する農業技術の開発に寄与するものと考えられる。トビイロウンカやツマグロヨコバイでもゲノム解読が、バイオタイプの変異の解明に寄与するものと期待される。

<謝辞>

本研究は、服部誠博士、矢野昌裕博士、山内歌子博士、中村匡利博士、長谷川毅博士、長村吉晃博士、松本隆博士、木村由紀子氏、橋野恵子氏、仁木晴美氏、渡辺美由紀氏 (以上 農

業生物資源研究所)、安井秀准教授(九州大学)、平林秀介博士(農研機構)、野々上慈徳氏(STAFF 研究所)、安藤露氏(STAFF 研究所) 他、多くの方々の協力を得て推進している。ここに改めて謝意を表す。本研究の一部は農林水産省 新農業展開ゲノムプロジェクト(QTL-2001) より支援を受けて実施した。

<参考文献>

- Endo et al. (2007) *The Plant Journal* 52(1): 157-166.
Hattori (1997) *Appl. Entomol. Zool.* 32: 409-412.
服部 (2006) *農業技術* 61(4): 153-157.
Harris (2003) *Annual Review of Entomol.* 48: 549-577.
平林 (2006) *農業及び園芸* 81 (1): 156-159.
平江 (2002) *北陸害虫研報* 50: 131-136.
堀 & 石川 (2008) *農林水産技術研究ジャーナル* 29(4): 28-33.
金田 (1990) 害虫抵抗性の遺伝. 稲学大成第三巻, 農文協, pp. 401-413.
Kawabe (1985) *JARQ* 19: 115-124.
今野 (2007) 植物の防御と昆虫の適応. 昆虫生理生態学, 朝倉書店, pp. 232-243.
Lobo et al. (2006) *BMC Genomics* 7:7.
Noda et al. (2008) *BMC Genomics* 9: 117.
野田 & 三田 (2008) 蚕糸・昆虫バイオテック 77(8):131-138.
Terada et al. (2002) *Nature Biotechnol.* 20: 1030-1034.
安井 (2007) 蛋白質 酵素 核酸 52(6): 730-734.

著者連絡先: 305-6085 つくば市大わし1-2 農業生物資源研究所 昆虫科学研究領域 昆虫
-昆虫・植物間相互作用研究ユニット
E-mail: yasumori@affrc.go.jp

バキュロウイルスの宿主制御メカニズムの解明

勝間 進（東京大学大学院農学生命科学研究科）

1. はじめに

昆虫ウイルスの一種であるバキュロウイルスは、80-180 kbp の2本鎖DNAをゲノムとして持つ大型のDNAウイルスである。古くから微生物農薬として利用されてきたが、近年、強力なポリヘドリンプロモーターを利用した外来タンパク質発現系（バキュロウイルスベクター）としても広く用いられるようになった。このような応用的な研究と平行して、ウイルスの全ゲノム解読、および個々の遺伝子の機能解析が急速に進められている。その結果、バキュロウイルスは自身の増殖、複製に必須な遺伝子のほかに多くの補助遺伝子（Auxiliary genes）を持つことが明らかになった。例えば、エクダイソンUDPグルコース転移酵素遺伝子（*egt*）は、昆虫の脱皮ホルモンであるエクダイソンの22位にグルコースを付加する酵素をコードし、エクダイソンを不活化することによって昆虫の脱皮を阻害することが知られている（文献1）。また、*inhibitor of apoptosis (iap)*は、バキュロウイルス感染時に細胞が防御反応として引き起こすアポトーシスを阻害して、ウイルスを効率よく増殖させるために重要な分子である（文献2）。バキュロウイルス感染によって引き起こされる宿主昆虫の死後溶解も、ウイルスが持つカテプシン（タンパク質分解酵素）やキチナーゼ（キチン分解酵素）によって積極的に引き起こされていることが明らかとなっている（文献3, 4）。

ウイルスの感染戦略を考える上で、宿主生物のゲノム情報は非常に重要である。2008年にバキュロウイルスの宿主昆虫の一つであるカイコのゲノム解読が完了した（文献5）。その情報を用いて、バキュロウイルス遺伝子との比較解析を行った結果、バキュロウイルスには多くの宿主遺伝子相同分子（宿主ホモログ）が存在することが判明した。上記の *egt* や *iap* と非常に高い相同性を示す遺伝子もカイコゲノム上に存在した。つまり、バキュロウイルスは他の大型DNAウイルスと同じように、宿主ゲノムからの遺伝子獲得によって、遺伝子数を増加させ、宿主昆虫の脱皮や細胞死の支配といった非常に高度な宿主制御機構を有するウイルスになったと推測される（図1）。また、宿主昆虫のゲノム情報と薬理学的手法を組み合わせることで、今までブラックボックスであったバキュロウイルスの巧みな宿主制御戦略も解明できるようになった（図2）。本発表では、こういったカイコ、およびウイルスのゲノム情報を利用したバキュロウイルスの宿主制御機構の研究例に関して紹介する。

2. バキュロウイルスがコードする宿主ホモログの網羅的同定

カイコとカイコ特異的に感染するカイコ核多角体病ウイルス（*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus: BmNPV）のゲノム情報を利用した解析により、BmNPVの推定遺伝子136のうち15（11%）が宿主ホモログであることが判明した（文献6）。ジーンターゲット法による遺伝子欠損ウイルスの作成により、そのうちの9遺伝子は、ウイルスの複製に関与しないことが判明した。その中には、*egt*、*iap*、プロテインフォスファターゼ（*ptp*）、カテプシン、キチナーゼ、そして繊維芽細胞成長因子（*vfgf*）が含まれていた。他の機能が不明な遺伝子もその欠損により、昆虫個体における病原性の低下がみとめられたことから、宿主ホモログの多くは宿主制御やウイルスの効率的感染に関わっていると考えられた。

3. 宿主ホモログのウイルス感染における機能

(1) *ptp*

BmNPV に感染したカイコは、感染末期に徘徊行動（ワンダリング）が誘起され、しきりに歩き回るようになる。遺伝子欠損 BmNPV を用いたスクリーニングにより、*ptp* 欠損 BmNPV に感染したカイコが感染後期のワンダリングを起こさないことが明らかになっている（文献 7）。また、興味深いことに、*ptp* と非常に相同性の高い遺伝子がカイコ cDNA ライブラリーから単離された。この *Bmptp-h* というカイコ遺伝子は、ワンダリング時の翅原基 cDNA ライブラリー由来のクローンであり、ワンダリング行動との関連に興味を持たれる。*Bmptp-h* 導入により *ptp* 欠損 BmNPV 感染カイコのワンダリングが一部回復したことから、カイコとバキュロウイルスの *ptp* が配列上だけでなく機能的にも類似していることが示された。*ptp* がどのようにして宿主昆虫の行動を制御しているか、そのメカニズムを明らかにできれば、微生物感染時における宿主の異常行動の分子基盤を解明できるかもしれない。

(2) キチナーゼ

バキュロウイルスがコードするキチナーゼは、死亡後の宿主の外骨格（キチン質）の分解や同じく死後溶解に関係するカテプシンの活性化に関わっている（文献 4, 8）。カイコゲノム上には、バキュロウイルスのものと非常に相同性の高いキチナーゼ遺伝子 *BmChi-h* が存在する。このキチナーゼは、バキュロウイルスと同じくエキソ型の酵素であり、免疫染色の結果、脱皮期のキチン質の分解に関与していると考えられた（文献 9）。しかしながら、*BmChi-h* を導入した組換えウイルスを作製し解析した結果、宿主溶解、アルカリ耐性、カテプシン活性化などは、バキュロウイルスのキチナーゼ特異的な機能であることが明らかになった（文献 10）。以上の結果から、バキュロウイルスは進化の過程で宿主から遺伝子を獲得するだけではなく、自身のゲノム上に獲得後独自の機能を付加し、それによって宿主を巧みに制御している可能性が示唆された。

(3) *vfgf*

繊維芽細胞成長因子（fibroblast growth factor: FGF）は、線虫からヒトまで保存された成長因子の一つであり、細胞増殖、遊走、および分化に関与している。ヒトにおいては、現在までに 22 種類の FGF が同定されており、そのうちの多くのが細胞外に分泌され、細胞膜上の受容体型チロシンキナーゼに結合することによって、細胞内シグナル伝達を引き起こすことにより生理活性を示すことが知られている。*vfgf* は鱗翅目昆虫に感染するバキュロウイルスに保存された遺伝子であり、双翅目や膜翅目昆虫に感染するバキュロウイルスのゲノム上には存在しない（文献 11）。また、バキュロウイルス以外で *fgf* をコードするウイルスは現在までに報告されていないことから、鱗翅目昆虫に効率的に感染するために必要な分子である可能性が高い。分子系統樹によると、カイコやキイロショウジョウバエの Branchless など昆虫の FGF と非常に近い関係にあることから、祖先型バキュロウイルスが、宿主昆虫から *fgf* を獲得したのと考えられる（文献 6）。BmNPV の vFGF (BmFGF) は、N 末端に典型的なシグナル配列を持つ分泌タンパク質である。BmFGF は、感染細胞培地中、および感染幼虫体液中に大量に分泌され、細胞膜上の宿主の FGF 受容体を介して、細胞のケモタキシス（走化性）を誘導する（文献 12, 13）。欠損ウイルスを用いた研究から、*vfgf* が幼虫の血球間におけるウイルス感染効率を高める働きをしていることが示されている（文献 14, 15）。以上のことから、vFGF は、宿主の FGF シグナルカスケードをハイジャックすることによって、ウイルス

の昆虫個体における感染効率を向上させていると考えられる。

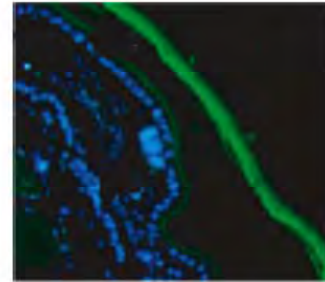
4. バキュロウイルス感染に必要な宿主遺伝子の同定:カイクゲノム情報を用いた薬理学的アプローチ

私のグループは、バキュロウイルス感染に必要な宿主遺伝子を、カイクゲノム情報と薬理学的手法を用いて同定するスクリーニング系を確立している。その概要を図2に示す。まず、哺乳類や他生物で薬理学的特徴がはっきりしている低分子化合物のウイルス増殖、および多角体産生における影響を調査する。その結果、何らかの影響があった化合物を選択し、そのターゲット遺伝子のカイクホモログを、ゲノム情報を利用してクローニングする。最後に、培養細胞におけるRNA干渉法により、その遺伝子が本当にウイルス感染に重要であるかを検討する、という流れである。現在までに、約50程度の典型的なシグナル分子の阻害剤について実験を行い、10遺伝子以上の候補分子を同定している。例えば、MAPキナーゼの阻害剤に関しては、U0126とSP600125がウイルス増殖を有意に押さえることが判明した。実際、これらのターゲット分子であるERKとJNKは、ウイルス感染時に活性化(リン酸化)されており、RNA干渉によるノックダウンによってウイルスの増殖は顕著に抑えられた(文献16)。このスクリーニング系を利用すれば、ウイルス増殖に重要な役割をする宿主遺伝子を同定し、ウイルスの宿主制御戦略を解明できるかもしれない。

5. おわりに

ウイルスの宿主制御機構の解明は、ウイルス研究において最も必要な命題である。カイク、およびバキュロウイルスのゲノム情報を利用して、バキュロウイルスの宿主ホモログが網羅的に同定され、それらを用いた巧みな宿主制御も明らかになった。一方、低分子化合物を利用することで、ウイルス感染に必要な宿主遺伝子も同定できるようになった。このような研究の深化により、ウイルスと宿主のせめぎ合いの進化的側面をシグナル伝達という分子レベルで垣間みることが可能になると期待している。また、ウイルスの宿主制御戦略を利用することで、新たな害虫管理技術が創成できないかと日々考えている。

宿主昆虫



キチナーゼ：脱皮時のキチン分解に関与

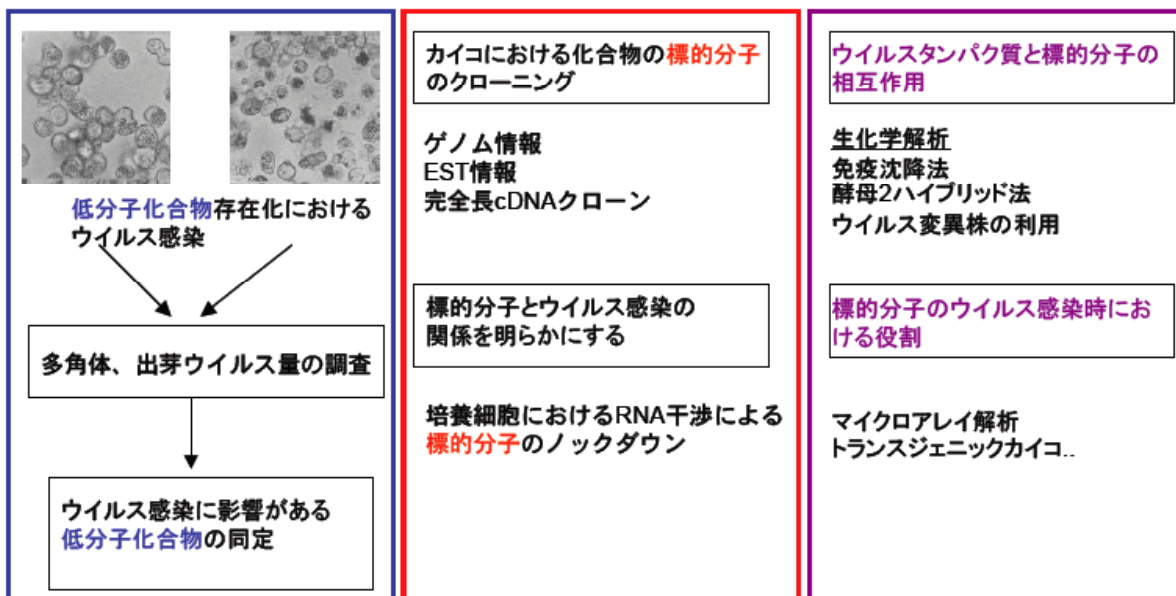
遺伝子獲得

バキュロウイルス



キチナーゼ：感染個体の死後溶解に関与

図1.バキュロウイルスは宿主から様々な遺伝子を獲得後、様々な機能を付加することで病原性に関する分子に改変し、宿主制御に利用している。



スクリーニング → ターゲットバリデーション → 機能解析

図2. 低分子化合物、およびカイコゲノム情報を利用したウイルス感染に必要な宿主因子の同定

引用文献

1. O'Reilly DR, and Miller LK (1989) A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase. *Science*, 245, 1110-1112.
2. Clem RJ, and Miller LK (1994) Control of programmed cell death by the baculovirus genes *p35* and *iap*. *Mol Cell Biol*, 14, 5212-5222.
3. Ohkawa T, Majima K, and Maeda S (1994) A cysteine protease encoded by the baculovirus *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol*, 68, 6619-6625.
4. Hawtin RE et al. (1997) Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. *Virology*, 238, 243-253.
5. The International Silkworm Genome Consortium (2008) The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol*, 38, 1036-1045.
6. Katsuma S, Kawaoka S, Mita K, and Shimada T (2008) Genome-wide survey for baculoviral host homologs using the *Bombyx* genome sequence. *Insect Biochem Mol Biol*, 38, 1080-1086.
7. Kamita SG et al. (2005) A baculovirus-encoded protein tyrosine phosphatase gene induces enhanced locomotory activity in a lepidopteran host. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 2584-2589.
8. Daimon T, Katsuma S, and Shimada T (2007) Mutational analysis of active site residues of chitinase from *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Virus Res*, 124, 168-175.
9. Daimon T et al. (2005) The *BmChi-h* gene, a bacterial-type chitinase gene of *Bombyx mori*, encodes a functional exochitinase that plays a role in the chitin degradation during the molting process. *Insect Biochem Mol Biol*, 5, 1112-1123.
10. Daimon T, Katsuma S, Kang WK, and Shimada T (2006) Comparative studies of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus chitinase and its host ortholog, *BmChi-h*. *Biochem Biophys Res Commun*, 345, 825-833.
11. Katsuma S, Shimada T, and Kobayashi M (2004) Characterization of the baculovirus *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus gene homologous to the mammalian FGF gene family. *Virus Genes*, 29, 211-217.
12. Katsuma S, Daimon T, Mita K, and Shimada T (2006) Lepidopteran ortholog of *Drosophila* Breathless is a receptor for the baculovirus fibroblast growth factor. *J Virol*, 80,

5474-5481.

13. Katsuma S et al. (2006) N-linked glycans of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus fibroblast growth factor are crucial for its secretion. *Biochem Biophys Res Commun*, 350, 1069-1075.

14. Katsuma S et al. (2006) In vivo and in vitro analyses of a *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus mutant lacking functional *vfgf*. *Virology*, 355, 62-70.

15. Katsuma S, Horie S, and Shimada T (2008) The fibroblast growth factor homolog of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus enhances systemic virus propagation in *B. mori* larvae. *Virus Res*, 137, 80-85.

16. Katsuma S, Mita K, and Shimada T (2007) ERK- and JNK-dependent signaling pathways contribute to *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus infection. *J Virol*, 81, 13700-13709.

害虫によるウイルス媒介メカニズムの解明とゲノム研究

(独) 農業生物資源研究所
昆虫・微生物相互作用研究ユニット
中島信彦

媒介昆虫と植物ウイルス

約 700 種とされる既知の植物ウイルスのうち、75%以上は昆虫により媒介される (Hogenhout et al., 2008)。植物病原ウイルスを媒介する代表的な昆虫として、アブラムシ・コナジラミ・アザミウマ・ウンカ・ヨコバイ類が知られている。これらの昆虫によるウイルスの伝搬様式は獲得した昆虫がどれくらいの期間にわたりウイルスを媒介できるかという観点から、非永続性伝染と永続性伝染に分けられる (福士, 1986; 平井ら, 1988)。非永続性伝染では、口針に付着したウイルスが伝播し、獲得吸汁した昆虫の媒介能力は数時間で失われる (口針型)。永続性伝染を起こすウイルスは媒介虫体内で増殖し、一度獲得したウイルスは生涯にわたり保持・媒介される (増殖型)。それらの中間型として、汁液と共に昆虫体内に取り込まれたウイルスが中腸から血体腔などを通じて唾液腺に移行してウイルスを伝播するがウイルス自体は昆虫体内で増殖しないもの (循環型) もあり、ウイルスの種類により媒介昆虫との相互関係の度合いが異なる。吸汁性ではない甲虫類や菌類・ダニ類によるウイルス媒介例も知られているが吸汁性昆虫の場合と比較すると数は少ない。

発病した植物のウイルス病害の進展を止める抗ウイルス薬剤は開発されておらず、一端発生した場合には蔓延阻止のために発病固体を抜き去る、埋める、焼却するなどの対策をとらねばならない。そのため、あらかじめ媒介昆虫を植物に接触させないために媒介昆虫の行動解析や、それに基づいた防虫ネットや光反射シートの施用、トラップ設置、殺虫剤散布などを行なうために多大な努力が払われている (本多, 2005; 大村, 2006; 奈尾, 2006; 奥田, 2006; 櫻井, 2006; 真壁, 2006)。ウイルスや害虫に対する耐病性・耐虫性品種の育成も行なわれており、害虫の根絶ではなく、さまざまな方法を駆使して経済的な被害が生じない程度に害虫密度を抑制して環境負荷をなるべく小さくするという総合防除 (IPM) が害虫管理の基本とされている。ただし、ウイルス媒介虫の場合は、僅かな吸汁でも媒介されるウイルス病の被害が大きくなるため、許容可能な密度水準が低いと考えられ、ウイルス伝搬を阻止する根本的な解決方法の開発が望まれる。媒介昆虫の体内で交わされるウイルスと昆虫組織・細胞との間の相互作用を解明し、その作用を阻害するような方法を見つけるためには、微小な媒介昆虫体内のタンパク質や遺伝子の同定が必須であり、これら媒介昆虫のゲノム研究の進展が必要である。

植物ウイルス媒介昆虫のゲノム解析の現状

農業関係の昆虫においてもゲノム解析や EST 解析が行なわれるようになり、得られた情報をウイルス媒介昆虫の摂食行動や増殖、あるいは関連微生物との相互関係が構築される分子的基盤などの解明に役立てようとする動きが盛んになり、今後、昆虫のウイルス媒介機能の解明にも焦点が当てられるようになると考えられる。米国 NCBI のウェブサイトには、昆虫でゲノム解析が行なわれているものとして、2009 年 4 月 1 日の時点で 51 種が掲載されている。その内訳はショウジョウバエ類が 24 種類、医学関連の吸血昆虫等が 15 種類、農業関係を含めたその他昆虫が 12 種類である。これらのうち、医学関連の病原体の媒介昆虫では蚊類が 6 件とそれ以外の吸血昆虫類が 9 件 (計 15 件) 掲載されているのに対し、農業関連では、エン

ドウヒゲナガアブラムシ (*Acyrtosiphon pisum*), ミカンクロアブラムシ (*Toxoptera citricida*) タバココナジラミ (*Bemisia tabaci*), ミカンキジラミ (*Diaphorina citri*) の 4 種類である。NCBI に掲載されていなくても EST 解析がモモアカアブラムシ (Ramsey et al., 2007) やヨコバイの一種である sharpshooter (Coudron et al., 2007)、トビイロウンカ (Noda et al., 2008) で行われている例もあり、媒介昆虫ゲノム解析を防除手段開発につなげるための取り組みは増している。

ゲノム解析と連動した研究例

2006 年 10 月に媒介昆虫に関するゲノム解析についてまとめられている (津田・中島, 2006) ため、以後の進展を中心に将来のウイルス媒介阻止に関係してくる可能性があると思われる研究例をまとめる。網羅できるわけではないが、最近 2~3 年間に論文発表された内容について引用文献も記しておくので適宜参照いただきたい。

1. 蚊、ショウジョウバエを材料としたもの

ゲノム解析やその応用研究は医学・理学系の研究材料で先行する傾向にあるため、蚊・ショウジョウバエを使用した研究例も紹介する。マラリアを媒介するハマダラカ (*Anopheles gambiae*) に続き、黄熱病ウイルス・デング熱ウイルスを媒介するネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) のゲノム配列が報告されている (Nene et al., 2007)。蚊同士の比較ゲノムに興味をもたれているようであるが、今後、ウイルス媒介に関する解析も盛んになってくるであろう。

ネッタイシマカにおいて、アルファウイルス感染により誘導される小分子 RNA が蚊の生存率に好影響を与えていることが報告され、ウイルスを保毒した媒介昆虫がウイルス感染による悪影響から免れて程々にウイルス濃度を保つ機構の解明につながる可能性が示唆されている (Myles et al., 2008)。

あるボルバキア系統に感染した宿主昆虫の寿命が半減することに着目し、ネッタイシマカに細胞質不和合性をおこすショウジョウバエ由来のボルバキアを感染させたところ、後代にも細胞質不和合性と短寿命が引き継がれた (McMeniman et al., 2009)。ウイルス媒介に重要な役割を担う寿命の長い感染昆虫個体を抑圧し、衛生・農業害虫に応用できる可能性が示唆されている。

Aedes aegypti のペプチドホルモンの一種 (Trypsin modulated oostatic factor、卵形成阻害や幼虫の節食行動にも関与する) をタバコモザイクウイルス外被タンパク質表層部分に組み込み、摂食した昆虫の成育を阻害する試みがなされている (Borovsky et al., 2006)。組換えウイルス表層に提示されるタンパク性物質の殺虫活性を利用する試みであり、短期間での組換えウイルス生産が可能な点や感染植物ごとすりつぶして野外散布にも使えそうな点は斬新である。

ショウジョウバエのハイスループット RNAi スクリーニング法を応用してインフルエンザウイルスの複製に重要な宿主遺伝子のスクリーニングが行なわれた (Hao et al., 2008)。同定されたハエの遺伝子に相同なヒト遺伝子の発現を siRNA で阻害したところ、培養細胞でインフルエンザウイルスの複製が抑制され、ワクシニアウイルスや水疱性口内炎ウイルスの複製には影響が見られないことが確認されており、新しい抗ウイルス剤の発見に繋がるものと期待されている。本来ならば昆虫に感染しないインフルエンザウイルスのエンベロープタンパク質を感染可能なウイルスのものに置き換えたキメラウイルスを作成して行なわれた実験であるが、媒介昆虫についても充実した EST ライブラリや cDNA ライブラリが利用できる状態に

なれば、ウイルス増殖可能な培養細胞が得られていない状況においても応用可能な研究手法であろう。

ショウジョウバエでは RNA ウイルス感染に対する防御システムとして RNA 干渉に関わる Dicer-2 が関与することが知られている (Galiana-Arnoux, et al., 2006)。最近、脂肪体においてウイルス感染 (FHV や DCV) 誘導性の反応が起きていることを示す結果が得られており、約 18 kDa のタンパク質が関与することが判明しているが、このタンパク質の実際の機能については今後の課題である (Deddouche et al., 2008)。また、ショウジョウバエに感染する様々なウイルスが引き起す宿主の免疫反応を解析したところ、ウイルスのグループによって宿主に起こす反応が異なり、昆虫もウイルスに対して様々な防御体制を持つと考えられている (Huszar and Imler, 2008)。

ボルバキアに感染したショウジョウバエでは非感染のものに比べて DNA ウイルスへの抵抗性に違いは認められないが、RNA ウイルスへの抵抗性が顕著に増進することが複数の研究室から報告されている (Hedges et al., 2008; Teixeira et al., 2008)。昆虫の RNA ウイルスへの抵抗性機構の中に他の微生物に感染して誘導されてくる未知の因子があることを示唆していると考えられる。

ショウジョウバエで得られているデータは、本来の宿主ではなくとも感染してしまうような広範囲の宿主を持つウイルスで得られたデータが多く、宿主特異性が高い昆虫増殖性のウイルスや、口針接触で媒介されるウイルスには直接適応できない場合もあろうが、ウイルス媒介昆虫の中にもボルバキアに感染する種が多く報告されており、複数の寄生体が引き起す宿主昆虫の反応がウイルス媒介にどのような影響を与えているのかなど、新たな疑問を提示している。

2. 農業関係のウイルス媒介昆虫を対象としたもの

エンドウヒゲナガアブラムシのゲノム解析が進行している。アブラムシの有効な形質転換系は確立されていないものの RNAi が有効であり、その効果は唾液腺においても確認されている (Mutti et al., 2006; 2008)。

カリフラワーモザイクウイルスのビリオンを吸着させるタンパク質が口針先端部分内側のクチクラに半埋没していることが示されている (Uzest et al., 2007)。ビリオンの吸・脱着を制御する因子は何か、それは植物汁液や昆虫唾液に由来するのかなど多くの新しい疑問を提示している (Hohn, 2007)。しかしそのタンパク質分子本体は不明であり、極微量しか存在しないタンパク質分子の同定のためには遺伝子側からの解析手法が必須であろう。エンドウヒゲナガアブラムシをはじめとするアブラムシ類のゲノム解析の進展が期待される (Jaubert-Possamai et al., 2007; Gauthier et al., 2007; Tagu et al., 2008)、タンパク質分子が同定されその構造が判明すれば、相互作用を阻害するような薬剤候補の選抜も可能になるかもしれない。

ルテオウイルスを媒介するムギミドリアブラムシではオオムギ黄萎病ウイルスの媒介能力に対するバイオタイプが存在し、複数の遺伝子が関与していることが示唆されている (Burrows et al., 2007)。昆虫のバイオタイプによってウイルス媒介能力に違いがあることは以前から知られており、ヨコバイが媒介するジェミニウイルスの媒介能が性染色体上の優性遺伝子に関連することやネッタイシマカのデングウイルス媒介能が QTL に依存することは知られているが、媒介能を制御する遺伝子の同定は困難を極めている。

タバココナジラミの体内に共生する細菌が分泌するタンパク質 (GroEL) が植物ウイルスの

虫体内移動にかかわると示唆されていた。トマト篩管で GroEL タンパク質を発現させたところ、トマト黄化葉巻ウイルスに抵抗性が付与された (Akad et al., 2007)。さらに、タバコでは GroEL に結合するとされていた複数の属にわたるウイルスの植物体内での増殖が抑制される効果が認められており、媒介昆虫体内でウイルスと相互作用を持つ物質が抵抗性植物育成の素材になりうることを示している (Edelbaum et al., 2009)。

ルテオウイルスを循環型で媒介するムギミドリアブラムシ (*Schizaphis graminum*) に媒介能力が異なる系統が得られており、これらの媒介能力の遺伝様式を交配実験で調べたところ、相加的に作用する複数の因子が関与すること、また、消化管と唾液腺では異なる因子が作用することが報告されている (Burrows et al., 2006)。

ウイルス媒介能に差があるムギミドリアブラムシ (*Schizaphis graminum*) 系統間での虫体タンパク質の二次元電気泳動解析が行なわれ、両系統で差がありかつウイルス粒子 (Polerovirus, Luteoviridae) と共沈した4種類のアブラムシ由来タンパク質が発見されている。そのうちの2種類は機能を推定できない新規タンパク質であり、2種類はいずれも小胞体の働きにかかわるとされるものであった。モモアカアブラムシの GroEL タンパク質が同じくルテオウイルスであるジャガイモ葉巻きウイルスのアブラムシ虫体内移動にかかわると示唆されているが、ムギミドリアブラムシの場合はウイルス粒子に結合するタンパク質としては血液成分のものは検出されていない (Yang et al., 2008)。

エンドウヒゲナガアブラムシ、ワタアブラムシ、モモアカアブラムシ、ミカンクロアブラムシの EST 解析データからペプチドホルモンの一括検索がなされ、生理活性ペプチド利用によるアブラムシ対策に先鞭をつけようとしている (Christie, 2008)。

一般には昆虫が媒介するウイルスは中腸から血体腔にウイルスが進入して唾液腺に到達すると考えられており、実際に循環型で媒介されるウイルスがヨコバイの中腸 (filter chamber) に蓄積して膜構造物に取り込まれている像も確認されている (Ammar et al., 2009)。ところが、脊椎動物に感染するラブドウイルスが神経向性を示すのと同様に、トウモロコシモザイクウイルス (ラブドウイルス科) の媒介昆虫であるトウモロコシウンカ (*Peregrinus maidis*) 体内では、ウンカの神経系を伝わってウイルスが唾液腺に到達する模様が観察されている (Ammar and Hogenhout, 2008; Ammar et al., 2009)。動物ウイルスの分類群に応じた組織指向性が昆虫ウイルスにも存在するようである。

現時点ではゲノム研究とは直接関わらない研究例のほうが多いが、昆虫体内でのウイルス挙動の解明は、遺伝子側からの解析対象とすべき器官やタンパク質分子種の絞り込みにつながるため、重要である。

おわりに

気候変動により南方由来の昆虫の棲息域が北上しつつあることが実際に確認されており (湯川・桐谷, 2008)、昆虫媒介によるウイルス病対策の重要性は増すと思われる。医学分野以外では抗ウイルス剤の開発もままならない状況であり、ウイルス媒介昆虫のゲノム解析からもたらされる成果が実際の IPM プロトコルの中に組込まれるまでの道のりはまだ遠いが、解析手法の技術的な進展速度をこの分野にも取り込む努力が求められる。昆虫がウイルスを媒介する機能そのものが解明途上にあるために基礎科学上の疑問解明と共に、必ずしも殺虫作用を伴わないウイルス媒介阻止剤や、新たな耐ウイルス性育種の素材につなげる研究視点も重要である。具体的な被害総額は算出されていなくとも、虫媒ウイルス防除の目的で施用されている防除資材への経費などを考慮すると、昆虫媒介性ウイルスが相当額の損失を招い

ているに違いない。手詰まりとならないように、新しい防除法の開発が可能となるよう研究シーズを集積せねばならない。

引用文献

- Akad, F., Eybishtz, A., Edelbaum, D., Gorovits, R., Dar-Issa, O., Iraki, N. and Czosnek, H. (2007) Making a friend from a foe: expressing a GroEL gene from the whitefly *Bemisia tabaci* in the phloem of tomato plants confers resistance to tomato yellow leaf curl virus. *Arch Virol* 152, 1323-1339.
- Ammar el, D., Gargani, D., Lett, J.M. and Peterschmitt, M. (2009) Large accumulations of maize streak virus in the filter chamber and midgut cells of the leafhopper vector *Cicadulina mbila*. *Arch Virol* 154, 255-262.
- Ammar el, D. and Hogenhout, S.A. (2008) A neurotropic route for Maize mosaic virus (*Rhabdoviridae*) in its planthopper vector *Peregrinus maidis*. *Virus Res* 131, 77-85.
- Ammar el, D., Tsai, C.W., Whitfield, A.E., Redinbaugh, M.G. and Hogenhout, S.A. (2009) Cellular and molecular aspects of rhabdovirus interactions with insect and plant hosts. *Annu Rev Entomol* 54, 447-468.
- Borovsky, D., Rabindran, S., Dawson, W.O., Powell, C.A., Iannotti, D.A., Morris, T.J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., DeBondt, H.L. and DeLoof, A. (2006) Expression of *Aedes* trypsin-modulating oostatic factor on the virion of TMV: A potential larvicide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 18963-18968.
- Burrows, M.E., Caillaud, M.C., Smith, D.M., Benson, E.C., Gildow, F.E. and Gray, S.M. (2006) Genetic Regulation of Polerovirus and Luteovirus Transmission in the Aphid *Schizaphis graminum*. *Phytopathology* 96, 828-837.
- Burrows, M.E., Caillaud, M.C., Smith, D.M. and Gray, S.M. (2007) Biometrical genetic analysis of luteovirus transmission in the aphid *Schizaphis graminum*. *Heredity* 98, 106-113.
- Coudron, T.A., Brandt, S.L. and Hunter, W.B. (2007) Molecular profiling of proteolytic and lectin transcripts in *Homalodisca vitripennis* (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cicadellidae) feeding on sunflower and cowpea. *Arch Insect Biochem Physiol* 66, 76-88.
- Deddouche, S., Matt, N., Budd, A., Mueller, S., Kemp, C., Galiana-Arnoux, D., Dostert, C., Antoniewski, C., Hoffmann, J.A. and Imler, J.L. (2008) The DExD/H-box helicase Dicer-2 mediates the induction of antiviral activity in drosophila. *Nat Immunol* 9, 1425-1432.
- Edelbaum, D., Gorovits, R., Sasaki, S., Ikegami, M. and Czosnek, H. (2009) Expressing a whitefly GroEL protein in *Nicotiana benthamiana* plants confers tolerance to tomato yellow leaf curl virus and cucumber mosaic virus, but not to grapevine virus A or tobacco mosaic virus. *Arch Virol* 154, 399-407.
- 福士貞吉 (1986) 植物のウイルス病 養賢堂
- Galiana-Arnoux, D., Dostert, C., Schneemann, A., Hoffmann, J.A. and Imler, J.L. (2006) Essential function in vivo for Dicer-2 in host defense against RNA viruses in drosophila. *Nat Immunol* 7, 590-597.
- Gauthier, J.P., Legeai, F., Zasadzinski, A., Rispe, C. and Tagu, D. (2007) AphidBase: a database for aphid genomic resources. *Bioinformatics* 23, 783-784.
- Hao, L., Sakurai, A., Watanabe, T., Sorensen, E., Nidom, C.A., Newton, M.A., Ahlquist, P. and Kawaoka, Y. (2008) Drosophila RNAi screen identifies host genes important

- for influenza virus replication. *Nature* 454, 890–893.
- Hedges, L. M., Brownlie, J. C., O'Neill, S. L. and Johnson, K. N. (2008) Wolbachia and virus protection in insects. *Science* 322, 702.
- 平井篤造・四方英四郎・高橋壮・都丸敬一 (1988) 新編植物ウイルス学 養賢堂
- Hogenhout, S. A., Ammar el, D., Whitfield, A. E. and Redinbaugh, M. G. (2008) Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annu Rev Phytopathol* 46, 327–359.
- Hohn, T. (2007) Plant virus transmission from the insect point of view. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(46), 17905–17906.
- 本多健一郎(2005) トマト黄化葉巻病と媒介コナジラミをめぐる最近の研究情勢. *植物防疫* 59, 299–304.
- Huszar, T., Imler, J. L. (2008) *Drosophila* viruses and the study of antiviral host-defense., *Advances in Virus Research* 72, 227–265.
- Jaubert-Possamai, S., Le Trionnaire, G., Bonhomme, J., Christophides, G. K., Rispe, C. and Tagu, D. (2007) Gene knockdown by RNAi in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *BMC Biotechnol* 7, 63.
- 真壁貞夫 (2006) 虫媒ウイルス病対策 *植物防疫* 60, 361–363.
- McMeniman, C. J., Lane, R. V., Cass, B. N., Fong, A. W., Sidhu, M., Wang, Y. F. and O'Neill, S. L. (2009) Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science* 323, 141–144.
- Myles, K. M., Wiley, M. R., Morazzani, E. M. and Adelman, Z. N. (2008) Alphavirus-derived small RNAs modulate pathogenesis in disease vector mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19938–19943.
- Mutti, N. S. Park, Y., Reese, J. C., Reek, G. R. (2006) RNAi knockdown of a salivary transcript leading to lethality in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J. Insect Sci.* 6, 38.
- Mutti, N. S., Louis, J., Pappan, L. K., Pappan, K., Begum, K., Chen, M-S., Park, Y., Dittmer, N., Marshall, J., Reese, J. C., Reek, G. R. (2008) A protein from the salivary glands of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, is essential in feeding on a host plant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 9965–9969.
- 奈尾雅浩 (2006) キュウリ黄化病の発生と診断法. *植物防疫*60, 346–351.
- Nene, V., Wortman, J. R., Lawson, D., and Severson, D. W. et al. (2007) Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science* 316, 1718–1723.
- Ng, J. C. and Falk, B. W. (2006) Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* 44, 183–212.
- Noda, H., Kawai, S., Koizumi, Y., Matsui, K., Zhang, Q., Furukawa, S., Shimomura, M. and Mita, K. (2008) Annotated ESTs from various tissues of the brown planthopper *Nilaparvata lugens*: a genomic resource for studying agricultural pests. *BMC Genomics* 9, 117.
- 大村敏博 (2006) 虫媒ウイルス病について. *植物防疫*60, 343–345.
- 奥田充 (2006) トスポウイルスおよびジェミニウイルスの発生実態と防除対策. *植物防疫* 60, 352–355.
- Ramsey, J. S., Wilson, A. C., de Vos, M., Sun, Q., Tamborindeguy, C., Winfield, A., Malloch, G., Smith, D. M., Fenton, B., Gray, S. M. and Jander, G. (2007) Genomic resources for *Myzus persicae*: EST sequencing, SNP identification, and microarray design. *BMC Genomics* 8, 423.

- 櫻井民人 (2006) アザミウマ類のトスポウイルス媒介特性と防除対策. *植物防疫*60, 356-360.
- Tagu, D., Klingler, J.P., Moya, A. and Simon, J.C. (2008) Early progress in aphid genomics and consequences for plant-aphid interactions studies. *Mol Plant Microbe Interact* 21, 701-708.
- Teixeira, L., Ferreira, A. and Ashburner, M. (2008) The bacterial symbiont Wolbachia induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol* 6(12), e2.
- 津田新哉・中島信彦 (2006) 昆虫のゲノム情報を利用した媒介昆虫と植物ウイルスの相互作用に関する展望. *植物防疫* 60, 474-477.
- Uzest, M., Gargani, D., Drucker, M., Hebrard, E., Garzo, E., Candresse, T., Fereres, A. and Blanc, S. (2007) A protein key to plant virus transmission at the tip of the insect vector stylet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17959-17964.
- Yang, X., Thannhauser, T.W., Burrows, M., Cox-Foster, D., Gildow, F.E. and Gray, S.M. (2008) Coupling genetics and proteomics to identify aphid proteins associated with vector-specific transmission of polerovirus (*Luteoviridae*). *J Virol* 82, 291-299.
- 湯川淳一・桐谷圭治 (2008) 地球温暖化の影響によると推察されるミナミアオカメムシとアオクサカメムシの我が国における分布域変化. *植物防疫*62, 14-17.

細胞内共生微生物による害虫防除とゲノム研究

田上 陽介
(静岡大学 農学部)

I. はじめに

昆虫は、体の小ささ、飛行能力、変態による休眠や多様な食性などの特徴により広く地球上で繁栄している生物である。そして、微生物も含め他の多くの生物と複雑な相互関係を築いている。微生物にとって、比較的安定した環境である昆虫の体内や細胞内も重要なニッチとなる。したがって、昆虫の体内や細胞内には数多くの微生物が生息する。細胞内に微生物が共生した場合、昆虫と微生物間には複雑な相互作用が生じる。そのため、昆虫が新しいまとまった生物機能を獲得し、新たな生態的地位へ進出・繁栄することが可能となる。このことから昆虫が広く繁栄している一因は細胞内共生微生物にあると捉えることもできる。

細胞内共生微生物は、宿主の細胞内で生活する。その特性により、宿主の栄養を補うなど宿主昆虫の「生存」に密接な関わりを持つ場合もある。また、細胞内共生微生物の多くはミトコンドリアや葉緑体の一般的な遺伝様式と同様に細胞質遺伝（母性遺伝）し、一方、宿主昆虫の核遺伝子は雌雄から等しく伝わるメンデル遺伝をする。このような細胞内共生微生物と宿主昆虫との遺伝様式の違いが適応戦略の違いとなり、細胞内共生微生物は宿主昆虫の「生殖」を制御することで自身の適応度を高めている。

害虫防除技術には現在様々な手法が開発されている。特に生物を利用した防除法として遺伝的防除（不妊虫放飼など）や生物的防除（生物農薬）などがある。これらの技術は、不妊虫放飼では雄を不妊化する技術、生物農薬の導入では天敵の大量増殖を行う技術が必要となる。いずれの方法も昆虫の「生存と生殖」が鍵となっている。したがって、昆虫の「生存と生殖」に関わる細胞内共生微生物に関する研究は、新しい防除技術開発の可能性を秘めているといえる。

分子生物学の進展により、新たな共生微生物の発見のみならず共生微生物の全ゲノム解読を非常に短期間で行うことが出来るようになった。細胞内共生微生物に関する研究は、細胞内共生微生物の様々な特性を活かし直接害虫防除に利用する技術を開発するだけでなく、共生微生物や宿主昆虫のゲノム解析やゲノム発現解析が進むことで、より効率的な防除技術の開発が期待される分野でもある。

本稿では昆虫の細胞内共生微生物とその特徴について紹介するとともに、細胞内共生微生物を利用しどのような害虫防除技術の開発が行われているのか、また、ゲノム研究からどのような技術を今後開発出来る可能性があるのかについて述べる。

II. 細胞内共生微生物

昆虫の共生微生物を生息場所から区分すると、体内（特に腸内）に共生している微生物と細胞内に共生している微生物に分けられる。また細胞内共生微生物は、特殊な体細胞（菌細胞）のみに感染している微生物と、宿主のほとんどの細胞内に見られる微生物に分けられる。特に菌細胞にのみ見られる共生微生物は宿主の生存・発育に必須となっていることが多い。

これら共生微生物の中で特に多くの昆虫に感染が確認されているのが細胞内共生微生物のウォルバキアであり、76%もの種が感染しているという報告もある (Jeyaprakash & Hoy, 2000)。

地域によって違いはあるものの日本国内の鱗翅目でも 44%以上の種に感染していることが明らかとなっていることから (Tagami & Miura, 2004)、約半数の昆虫種にはウォルバキアが感染していると考えられる。また、ウォルバキア以外にも多くの昆虫に感染している共生微生物が近年明らかにされつつあり、およそ 50 の共生微生物が見つかった (Hyspa & Novakova, 2008)。

III. 共生微生物と宿主昆虫との関係

ウンカの酵母様微生物やアブラムシのブフネラは宿主に必要な栄養を生産し与えており、そのような共生微生物 (主に菌細胞に見られる微生物) は宿主の生存に必須といえる。それに対して、ウォルバキアは様々な昆虫に感染し、それぞれが多様な系統に分けられ、宿主にとって必須であったり、寄生的であったりとその影響も様々である。害虫防除の観点から特に注目されているのはウォルバキアによる宿主の生殖操作であり、本稿では産雌性単為生殖化と細胞質不和合について説明する。

ウォルバキアによる産雌性単為生殖化 (図 1 の右側) とは、単為生殖 (産雄性単為生殖: 図 1 の左側) を行うハチ、ダニやアザミウマ等で知られている現象である。通常、未交尾では雄を産むはずの雌が、感染することで未交尾のまま雌を産み、雌のみで世代交代を繰り返すようになる。ウォルバキアによって産雌性単為生殖化が誘導された種は 53 種知られている (田上 & 三浦, 2008)。

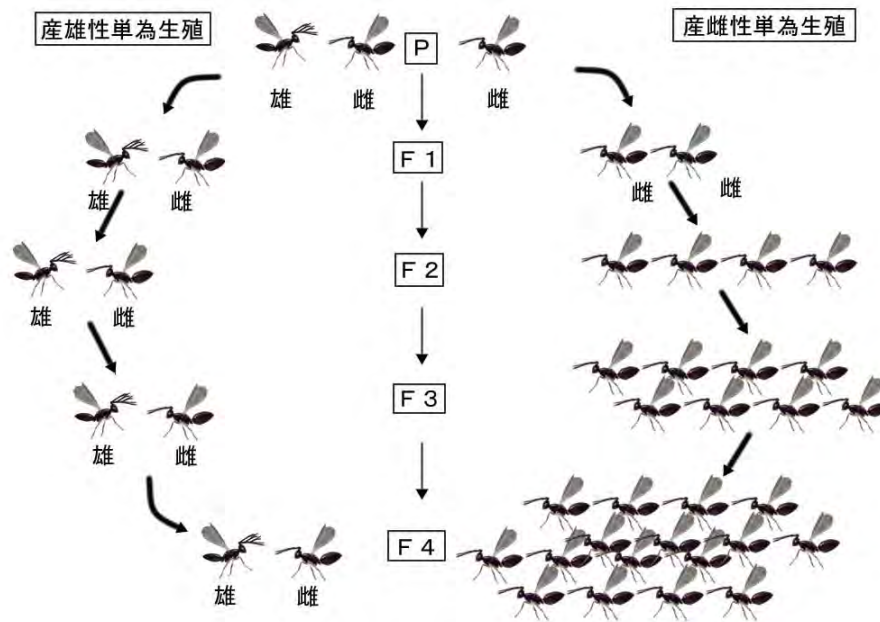


図 1 産雄性単為生殖と産雌性単為生殖

ウォルバキアによる細胞質不和合 (一方向性細胞質不和合) とは、感染雄と非感染雌の交配では、子孫が発育途中で死んでしまう現象を指す (表 1)。この場合、感染雌の子はどの組み合わせでも死亡しないため、感染個体が地域に広まると考えられる。実際そのような例がショウジョウバエやウンカなどいくつかの昆虫種で確認されている (Turelli & Hoffmann, 1991, Hoshizaki & Shimada, 1995)。

表1 一方向性細胞質不和合

	感染♂	非感染♂
感染♀	○	○
非感染♀	×	○

■は子孫が感染する組み合わせ

○は生存, ×は死亡を示す

ウォルバキアが宿主に与える影響には、ほかにも感染によって死亡率が高くなる現象や成虫の生存日数が短くなる現象など (Tagami et al., 2001, Min & Benzer, 1997)、宿主によって明らかに負の影響が出る場合も知られている。

IV. 細胞内共生微生物の害虫防除への応用

細胞内共生微生物は宿主昆虫間と様々な相互作用を持つことから、これらの相互作用を利活用することで害虫を防除する事が可能となる。本稿では細胞内共生微生物を利用した害虫防除に関する研究例と、今後開発が期待される項目について挙げる。

1. 産雌性単為生殖化の利用

天敵寄生蜂は生物的防除において重要な位置を占めている。細胞内共生微生物により産雌性単為生殖化した天敵寄生蜂を生物的防除に利用することで様々な利点がある。まず天敵を大量増殖する場合、理論的には増殖効率が2倍となる (図1)。さらに交配により能力に劣る系統に置き換わる可能性が減少し、近親交配の影響も考慮する必要がなくなる。また天敵として放飼した場合、実際に害虫を退治してくれるのはほとんど雌であるため、防除効果も上がる。

有望な天敵寄生蜂への産雌性単為生殖化を引き起こすウォルバキアの移植はいくつかの機関で行われている。その結果、感染し継代させることや、産雌性単為生殖化させることには成功しているが、産雌性単為生殖化した系統の維持には至っていない。この原因として寄生蜂の複雑な性決定メカニズムや、天敵寄生蜂と細胞内共生微生物間の複雑相互作用が影響していると考えられる。産雌性単為生殖化の分子メカニズムを解明することで、効率的な産雌性単為生殖系統の開発が期待できるだろう。

2. 宿主の生存日数を減少させるウォルバキアの利用

2009年 McMenimanらは、ショウジョウバエの成虫寿命を短くするウォルバキア (wMelPop) を、デングウイルスを媒介するネッタイシマカに移植することに成功した。通常、ウォルバキアの移植は系統的に近い宿主間で行われるため、この試験では蚊の培養細胞に wMelPop を感染させ、3年間維持後移植に用いられた。

多くの病原体には潜伏期間が必要であるため、この研究で wMelPop に感染させることで成虫寿命が短くなり、ヒトへのウイルス媒介を抑えることが可能となる。また、細胞質不和合性を利用することで wMelPop 系統を野外に広めることが可能となる。まだ実用化には至っていないが、この技術は植物病原ウイルスを媒介する昆虫に応用することで同様な効果が期待できるかもしれない。

3. 細胞質不和合の利用

不妊虫放飼法は日本では南西諸島で行われている、不妊雄の放飼によって子孫を減らし、害虫を防除する方法である。ウォルバキアによる細胞質不和合では、感染雄が不妊雄と同等の働きをすることとなる。Zabalou ら (2004) は、ウォルバキアを移植し細胞質不和合性を持つチチュウカイミバエを作出した。さらに室内試験ではあるが、感染雄を大量に放飼することで個体群密度の抑制に有効であることを確認している。

アメリカでは施設栽培のキクにおいてマメハモグリバエの不妊虫を用いた防除が考えられており、マメハモグリバエでは一部の系統から細胞質不和合を引き起こすウォルバキアに感染していることが明らかになっていることから (Tagami et al., 2006)、施設内での感染虫の放飼は害虫防除に効果的かもしれない。

4. 抗生物質殺菌剤の利用

これまで紹介してきた方法は細胞内共生微生物を活用する方法であるが、細胞内共生微生物を抗生物質により取り除くことで害虫を防除する方法も考えられている (田上ら、未発表)。

植物病原微生物の防除手段として抗生物質殺菌剤が利用されているが、抗生物質殺菌剤はウォルバキアの除去も可能であることが確かめられている。例えばアザミウマ害虫には、ウォルバキアに感染し産雌性単為生殖化している種がある。このアザミウマが寄生する植物に市販の抗生物質殺菌剤を通常の濃度で散布すると、1 週間程度後から産まれる子孫はすべて雄となる (田上ら、未発表)。雄は子孫を残さないため、害虫数の減少に結びつく。ただし、室内でのケージ試験では害虫数の減少には至っていない。また、市販の天敵寄生蜂や在来天敵には共生微生物により産雌性単為生殖化している種もあり、抗生物質殺菌剤の散布は天敵の効力低下に結びつく可能性があり、注意が必要となる。

5. 耐性の利用

昆虫にも数々の病原体があり、BT 剤や昆虫病原糸状菌製剤のような生物農薬も開発されている。Hedges ら (2008) は、ウォルバキアに感染することでいくつかの致死性ウイルスに対する耐性が増すことをショウジョウバエの一種で明らかにしている。この共生微生物の影響を応用することで、例えば天敵にウイルス耐性に関わるウォルバキアを感染させることで耐性が高く使いやすい天敵を作出したり、昆虫病原ウイルスと天敵の同時利用を可能にしたりすることができると考えられる。

このように様々な形で細胞内共生微生物を利用した技術開発が可能ではあるが、現状では思い通りにいかないことも多い。この原因には細胞内共生微生物による宿主操作のメカニズムが明らかになっておらず、試行錯誤に頼らざるを得ないためと考えられる。

V. 細胞内共生微生物のゲノム研究

細胞内共生微生物と宿主昆虫における相互作用のメカニズムを明らかにする上で、細胞内共生微生物のゲノム解析は重要である。近年、技術の進歩により微生物の全ゲノムを短期間で明らかにすることが可能となっている。昆虫の細胞内共生微生物も、その宿主との相互作用が注目されていることからいくつかの種や系統で全ゲノム解析が進められている。それらの成果によりいくつかの遺伝子の重要性が示唆されている。

ウォルバキアのゲノムには多くの ankyrin ドメインがある。ankyrin リピートを持つタンパク質は細胞周期調節に関わっていることから、細胞周期調節のズレによって生じていると考えられる細胞質不和合などの宿主操作に関わっていることが示唆されており、研究が進められている (Iturbe-Ormaetxe et al., 2005)。また、細菌からタンパク質を分泌するシステムであるタイプ IV 分泌システムをコードするオペロンがウォルバキアには存在することが

知られており、宿主と共生微生物の相互作用を明らかにする上で注目されている (Wu et al., 2004; Foster et al., 2005)。

細胞内共生微生物のバクテリオファージにも注目が集まっている。ウォルバキアには多数のプロファージ遺伝子があり、ファージがウォルバキアの密度調節など宿主との関係に関わっていることが示唆されている (Wu et al., 2004)。

細胞内共生微生物の種間ゲノム比較も重要である。全ゲノム解析が進行中であるカルディニウムは、系統的には異なるウォルバキアと同様の宿主操作を行う。これら微生物のゲノムを比較することで宿主操作のメカニズム解明に寄与できると考えられる。

今後さらなる細胞内共生微生物のゲノム解析、宿主昆虫のゲノム解析や昆虫細胞内での培養を利用した *in vitro* な研究が進むことで、生理活性物質や有用遺伝子を活用した害虫防除法の開発、性質を改変した害虫や天敵を用いることで、害虫防除に様々な応用が可能となるだろう。

VI. まとめ

本稿ではウォルバキアによる生殖操作を中心に取り上げたが、他にも多くの細胞内共生微生物が存在し、それらは宿主の栄養生理・代謝・生態など様々な面に関わっている。これら細胞内共生微生物の働きに関するゲノム解析も含めた多面的な研究の進展は、斬新な害虫防除技術の開発につながる可能性を秘めていると考えられる。

引用文献

- Foster et al. (2005): Plos Biol. 3: e21.
Hedges et al. (2008): Science 322: 702.
Hoshizaki & Shimada (1995): Insect Mol. Biol. 4: 237-243.
Hyspa & Novakova (2008): In Insect Symbiosis vol.3, CRC Press, Boca Raton, p. 1-31.
Iturbe-Ormaetxe et al. (2005): J. Bacteriol. 187: 5136-5145.
Jeyaprakash & Hoy (2000) Insect Mol. Biol. 9: 393-405.
McMeniman et al. (2009): Science 323: 141-144.
Min & Benzer (1997): Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 10792-10796.
Tagami et al. (2001): J. Invertebrate Pathol. 78: 267-271.
Tagami & Miura (2004): Insect Mol. Biol. 13: 359-364.
Tagami et al. (2006): Biol. Con. 38: 205-209.
田上 & 三浦 (2008): 応動昆 51: 1-20.
Turelli & Hoffmann (1991): Nature 353: 440-442.
Wu et al. (2004): Plos Biol. 2: 327-341.
Zabalou et al. (2004): Proc. Natl. Acad. Sci. 101: 15042-15045.

遺伝子組換えを利用した害虫防除

独立行政法人 農業生物資源研究所
畠山正統

昆虫における遺伝子組換えは、1982年にP因子というトランスポゾンを用いてキイロシヨウジョウバエではじめて成功して以来、様々な昆虫で試みられ、今日では4つの昆虫目の20以上の種で、遺伝子組換え技術が確立されている。キイロシヨウジョウバエでの遺伝子組換えは主として、遺伝的バックグラウンドの豊富なこのモデル昆虫の遺伝子機能解析の道具として使われてきたものであるが、それ以外の昆虫では、農業害虫や病原媒介性の昆虫を遺伝的に改変して無害化するという応用も目的として開発されてきた。さらに、近年の昆虫ゲノム解析による遺伝情報の蓄積によって、遺伝的改変に利用できる導入遺伝子候補の探索が容易になりつつある。ここでは、昆虫の遺伝子組換えの現状、遺伝的防除への利用を目指した技術開発、実用に向けた国外での動向を紹介する。

遺伝子組換え法

昆虫での遺伝子組換え技術の進展は、高等なハエ目昆虫にしか適用できなかったP因子とは別の、*Minos*、*Hermes*、*piggyBac*、*mariner*などのトランスポゾンベクターとして開発したことによるところが大きい。なかでもイラクサキンウワバ (*Trichoplusia ni*) から単離された *piggyBac* をもとにしてつくられたベクターは種を越えて利用できることが知られている。遺伝子導入のベクターに汎用される *piggyBac* トランスポゾンは、逆方向末端反復配列 (Inverted Terminal Repeat: ITR) の間に自身の転移を触媒する転移酵素遺伝子をもつ。遺伝子組換えには、ITR の間に導入したい遺伝子と選抜のためのマーカー遺伝子を挿入したベクタープラスミドと、ITRを持たず転移酵素のみを供給するヘルパープラスミドを準備する。これらを発生初期 (細胞性胚盤葉になる前) の胚に顕微注入し、転移酵素を産出させると、ベクタープラスミドの ITR に挟まれた DNA 領域が切り出され、ゲノム内の特定の配列に挿入される。その子孫からマーカー遺伝子の発現を目印にして遺伝子組換え体を選抜する。遺伝子組換えのマーカー遺伝子としては、緑色蛍光タンパク質 (GFP) など、蛍光タンパク質遺伝子が用いられている。

優性致死遺伝子の導入による不妊虫放飼法

不妊虫放飼法 (Sterile Insect Technique: SIT) は、遺伝的手段による害虫防除としてその有効性が証明された方法である。放射線照射により精子の染色体に損傷を与えて不妊化した大量の雄個体を野外に放出することで、特定の種を広範囲にわたって制御できる。しかしながら、放射線照射のための大規模な施設が必要である、誘発される不妊の原因が一様でない、不妊化虫の生存率や交尾競争力の低下などの問題点が指摘されている。このような問題を克服できるものとして、放射線照射のかわりに遺伝子組換えを利用し、優性致死になる遺伝子を導入した昆虫を利用する SIT が試みられはじめた。このような新しい SIT は、"Release of Insects carrying a Dominant Lethal (RIDL)" とよばれている。遺伝子組換えによる不妊や致死の誘発は、原因遺伝子が明らかで、ゲノム中の遺伝子挿入部位も特定できる。

優性致死を誘発する遺伝子としては、過剰発現させると細胞死に至る原癌遺伝子の *ras* 遺

伝子、異所的に発現するとアポトーシスを誘導する *head involution defective (hid)* 遺伝子などが利用できる。キイロショウジョウバエやチチュウカイミバエでは、このような遺伝子を導入した個体を野生型の集団と交尾させ、特定の条件下、例えば胚発生の初期に発現する遺伝子のプロモーターと組み合わせることで、効果的に子孫を「殺せる」ことが証明されている。今後の昆虫ゲノム情報が蓄積されるにしたがって、優性致死遺伝子として利用できる候補遺伝子の選択肢も増えると期待される。

導入遺伝子の発現制御

優性致死遺伝子を導入した個体を SIT に用いる場合には、野外放飼に先立って、優性致死遺伝子を導入した個体をあらかじめ室内で増殖する必要がある。当然ながら、その過程で致死遺伝子を発現させるわけにいかない。したがって、導入遺伝子が特定の条件でのみ発現するように制御する必要が生じる。防除の対象となる昆虫では、残念ながら現時点では、発現時期や発現場所の明らかな遺伝子のプロモーターは非常に少ない。そこで、プロモーターに依存しなくても遺伝子発現調節が可能な制御システムが開発されている。そのひとつが、大腸菌のテトラサイクリン耐性オペロンを利用した発現制御システム (Tet-Off) である。テトラサイクリン制御活性化因子 (tTA) が、転写調節応答エレメント (TRE) に結合するとその下流にある遺伝子の発現が誘導される。ところが、抗生物質のテトラサイクリンが存在すると、tTA が TRE に結合できなくなるため遺伝子は発現しない。したがって、致死遺伝子をもつ個体の増殖の際にはテトラサイクリンを含む飼料で飼育すればよい。このシステムは、ハエ目、チョウ目、およびハチ目のいくつかの種で機能する。また、チチュウカイミバエでは過剰発現して蓄積した tTA には致死作用があることが示され、致死遺伝子のかわりに tTA を TRE の下流に連結して自己制御させると、より簡単に優性致死を誘発できる。

農業害虫でも病原性媒介昆虫でも、多くの場合、害を及ぼすのは雌であり、必ずしもすべての子孫を殺す必要はない。雌特異的致死遺伝子を用いる、あるいは tTA を雌特異的に発現する遺伝子のプロモーターで制御するすると、RIDL による防除の対象を雌に限定できる。最近では、性決定遺伝子の性特異的スプライシングで性が決定されるハエ目では、導入する致死遺伝子の ORF 内に雌でのみ取り除かれるイントロン配列を挿入して、雌のみを致死にするようなシステムも開発された。生き残った雄は雌特異的な致死遺伝子をもっているため、次の世代で再び不妊化個体としての役割を果たす。

遺伝子組換えによる新形質の付与

農業害虫の防除では、効果的に対象害虫を「殺す」ための RIDL が有効な手段だと考えられるが、病原性媒介昆虫の制御では、個体群が広範囲に分布することや個体の移動を考慮すると、RIDL による集団数の抑制よりも、感染性や伝播能を抑制するほうが現実的で効果的である。マラリア原虫は吸血した宿主のハマダラカの赤血球内で受精、増殖し、その後唾液腺に移行する。このハマダラカがヒトなどの脊椎動物を刺すと、唾液腺からマラリア原虫がその体内に注入されてマラリアを発症させる。そこで、赤血球を溶かす作用のあるレクチンの一種をコードする遺伝子をハマダラカに遺伝子組換えで導入して中腸で発現させると、赤血球が溶解されてハマダラカ体内でのマラリア原虫の増殖が阻害される。また、自然免疫機構に関わるセクロピン遺伝子やディフェンシン遺伝子、あるいはマラリア原虫の唾液腺への移行を妨げる効果のある遺伝子を導入すると、ハマダラカ体内でのマラリア原虫の生活環が阻害される。このように、遺伝子組換えで導入した遺伝子の作用により、マラリア原虫の宿主で

あるカの体内での増殖を阻害することで、結果としてマラリア伝播を抑止できる。

導入遺伝子のゲノム内での安定化

昆虫の遺伝子組換えに広く用いられるトランスポゾン由来のベクターは、転移酵素の触媒活性によりゲノム中を転移する。したがって、遺伝子を組換えようとする昆虫が、ベクターに用いたトランスポゾンに対する内在性の転移酵素、あるいは機能的によく似た酵素をもっていれば、挿入された遺伝子がゲノム中から切り出されて脱落したり、再転移する危険性がある。したがって、昆虫の遺伝子組換えでは、導入された遺伝子の安定性が、最も懸念される問題のひとつである。トランスポゾンベクターを利用して導入した遺伝子のゲノム内での安定性を維持するために、転移酵素が認識する ITR 部分を含むトランスポゾン由来の DNA 配列を完全に取除き、挿入遺伝子を不動化する技術も開発されている。

国外の動向と残された課題

このように実験室レベルの研究から、遺伝子組換え昆虫の遺伝的防除への利用は技術的には可能であると考えられる。国外では、これらの遺伝子組換え昆虫を放飼した場合の適応度についての検証が、制限区域（隔離圃場やケージ）、あるいは開放圃場をつかって試行されている。チチュウカイミバエではケージ内での放飼実験から、優性致死遺伝子を導入した雄に交尾競争力の低下は見られず、RIDL に利用できると報告されている。また、マラリアを媒介するハマダラカや黄熱病を媒介するネッタイシマカでは、制限区域内での実験から、導入した遺伝子によって適応度に差が生じ、導入遺伝子をホモで持つ場合には適応度が低下すると報告されている。一方、このような適応度の低下は、遺伝子組換え系統を増殖する際の近親交配や、調査した個体数の少なさに起因するもので、これらの条件を排除すると適応度は低下しないとされている。遺伝子組換えネッタイシマカについては、今後マレーシアで開放圃場での放飼実験が計画されている。

いまのところ野外に放飼された遺伝子組換え昆虫の適応度、行動、周辺環境への影響について明確な回答が出ているわけではない。しかしながら、米国農務省（USDA）はアリゾナ州の開放圃場で、3種の遺伝子組換えミバエと遺伝子組換えワタアカミムシガの大規模な放飼実験を行ない、既存の放射線照射に代えて遺伝子組換えを SIT に利用することを提言している。このように国外では遺伝子組換え昆虫を利用した害虫防除が実用化されそうな状況になっている。

シンポジウム事務局

独立行政法人農業生物資源研究所 篠田徹郎、山本公子

E-mail: insectgenome@nias.affrc.go.jp

FAX: 029-838-6121