

北海道奥尻町にて採集した *Aedes* 類蚊幼虫より分離した 新規植物ウイルス様ウイルスに関する研究

応用分子生物学講座 応用分子昆虫学分野
川上 広太

(背景と目的)

ヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*) を始めとする *Aedes* 属の蚊によって媒介されるデング熱や黄熱等の感染症に対する最も有効な予防法は、合成殺虫剤による病原体媒介蚊のコントロールである。しかし、殺虫剤耐性蚊の出現や合成殺虫剤の標的昆虫特異性の低さに起因する環境問題が顕在化してきたことで、合成殺虫剤に代わる代替防除法の必要性が高まってきた。我々は低環境負荷型の代替防除法の候補の一つとして、蚊幼虫感染性ウイルスに注目した。蚊幼虫感染性ウイルスは防除資材としての可能性を保持しているのにも関わらず、その分子生物学的研究は進んでおらず、現在までに防除資材として実用化された蚊幼虫感染性ウイルスは現在までに一例もない。そこで本研究では蚊幼虫防除資材の探索を目的として、新規蚊幼虫感染性ウイルスの分離および増殖特性に関する基礎研究を行った。

(方法)

野外にて採集した蚊幼虫を破碎・濾過して得た濾液を *Aedes albopictus* 由来培養細胞 C6/36 細胞に接種して細胞変性効果 (CPE) を観察した。CPE を示した細胞の培養上清からショ糖密度勾配超遠心法によってウイルス粒子を精製し、透過型電子顕微鏡観察を行った。また精製ウイルス粒子から核酸を抽出し、アガロースゲル電気泳動および核酸のシークエンス解析を行った。得られた塩基配列からゲノム構造の推定および系統解析を行った。またウイルス接種によって CPE を示した C6/36 細胞およびウイルスを含む水中で飼育した *Aedes albopictus* 幼虫個体から total RNA を抽出し、ウイルスゲノムと strand 特異的に相補的な配列を持つプライマーを用いて、ウイルス核酸に関する strand-specific RT-PCR を行った。

(結果)

2010 年に北海道奥尻町にて採集した *Aedes* 類蚊幼虫から得た濾液が C6/36 細胞に対して強い CPE を示し、その培養上清から直径約 50-70 nm の楕円形のウイルス様粒子が精製された。このウイルスをオクシリウイルス (OKV) とした。精製 OKV 粒子には、少なくとも 9,705 nt の positive single-strand RNA (RNA1) が含まれる事が分かった。RNA1 には少なくとも 3 つの ORF (ORF1-3) が存在しており、ORF1 には methyltransferase, FtsJ-like methyltransferase, RNA helicase および RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) の保存アミノ酸ドメインが見つかった。それらアミノ酸配列から OKV は“alpha-like superfamily”に分類される新規ウイルスであることが分かった。RdRp の保存アミノ酸配列を用いた系統解析の結果、OKV は植物ウイルスと近い系統的関係にあり、特に 4 種の未分類の植物感染性ウイルスと独立したクレードを形成することが示された。また OKV ゲノムである RNA1 に関する strand-specific RT-PCR によって、OKV を含む水の中で飼育した *Aedes albopictus* 幼虫個体および OKV 接種 C6/36 細胞の両方から、RNA1 の negative strand が検出された。

(考察)

Aedes 類蚊幼虫から分離され、C6/36 細胞に対して強い CPE を示し、且つ CPE を示した C6/36 細胞および OKV を含む水の中で飼育した *Aedes albopictus* 幼虫個体の両方から RNA1 の negative strand が検出されたことから、OKV は C6/36 細胞および *Aedes albopictus* 幼虫個体の両方に感染性を保持していることが示唆された。一方で RNA1 の塩基配列から、OKV は植物感染性ウイルスと進化的に近い関係にあることが推定された。以上より、OKV は蚊幼虫防除資材に関する応用研究のみならず、植物感染性ウイルスと蚊感染性ウイルスの進化や生態に関する基礎研究においても重要な研究材料となる新規 RNA ウイルスであることが考えられた。