HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	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
Author(s)	後藤, 千枝
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	乙第4669号
Issue Date	1994-12-26
DOI	https://doi.org/10.11501/3080075
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/50138
Type	doctoral thesis
File Information	000000279869.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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

後藤千枝

①

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

後藤千枝

目　次

第Ⅰ編　緒言 …… 1

謝辞 …… 4

第Ⅱ編　研究史 …… 5

第Ⅲ編　実験の部

第１章　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 …… 12

第１節　目的 …… 12

第２節　実験材料および方法 …… 13

第３節　結果 …… 16

第４節　考察 …… 31

第２章　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 …… 37

第１節　目的 …… 37

第２節　実験材料および方法 …… 38

第３節　結果 …… 43

第４節　考察 …… 62

第３章　ＸｃＧＶの形態並びに感染特性 …… 66

第１節　目的 …… 66

第２節　実験材料および方法 …… 66

第３節　結果 …… 69

第４節　考察 …… 82

第４章　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 …… 88
第１節　目的 …… 88
第２節　実験材料および方法 …… 89
第３節　結果 …… 91
第４節　考察 …… 112

第Ⅳ編　総合考察 …… 115

第Ｖ編　英文総括 …… 121

第Ⅵ編　参考文献 …… 125

第Ⅰ編　緒言

農作物を安定供給するためには病害虫の防除は欠くことができない。化学農薬の人畜への毒性や生態系攪乱、抵抗性害虫の出現が大きな問題となった1970年代以降、多種類の防除素材の効果的組み合わせによる「総合防除」[88]の実現に期待が寄せられたが、実用性の高い新素材はなかなか開発されず、現在も病害虫防除は化学農薬に依存している。しかし、環境保全や農作物の安全性に対する社会の関心は年々高まっており、消費者のみならず生産者からも化学農薬万能主義からの脱却を望む声が強まっている。化学農薬への依存度を低くするためには、新しい防除手段の開発が必要であり、現在もフェロモンによる交信攪乱、天敵昆虫や昆虫病原微生物の利用が検討され、実用化のための試験が続けられている[75]。昆虫病原微生物の中でもバキュロウイルスは鱗翅目を中心にごく限られた範囲の昆虫と甲殻類に対してのみ病原性を示し、しかも特異性が高いため[29,60]、人畜への安全性が特に高い害虫防除素材として注目されている。バキュロウイルスは、宿主特異性が高いという特性を持つため捕食性天敵類に病原性を示さず、このようなウイルスが化学合成農薬の代替として害虫防除に使用できれば、化学合成農薬による影響を受けやすい天敵昆虫を利用した害虫防除の範囲が拡大することも期待できる。

バキュロウイルス科は、核多角体病ウイルス Nuclear polyhedrosis virus （ＮＰＶ）、顆粒病ウイルス Granulosis virus （ＧＶ）、封入体非形成バキュロウイルス Non-occluded baculovirus （ＮＯＶ）の３つの属からなっており、ＮＰＶとＧＶは宿主細胞内で増殖したウイルス粒子がウイルス由来のタンパク質を主成分とする封入体に包まれた状態で形成される[37,102]。ＮＰＶでは多角体(polyhedron, pl.polyhedra)、ＧＶでは顆粒体(capsule)と呼ばれるこれらの封入体は、ウイルスを紫外線や化学物質から守り、安定な状態を保つ働きをしているものと考えられている[106,107]。ＮＰＶとＧＶは、ウイルス粒子を取り囲む封入体が光学顕微鏡で観察可能な大きさであり、封入体を遠心分離によって精製することができるため、超遠心分離による精製が不可欠な他のウイルスに比べて非常に扱い易いという利点を持っている。封入体は安定性が高く、製剤化が容易であるため、農薬として単独で利用されたり、また、化学合成農薬と混用することも可能であるため、比較的古い

時代から防除素材として研究が進められてきた[62]。

今日までに、日本では20種近く、海外を合わせると100種以上の害虫でウイルスによる防除試験が試みられており、ハスモンヨトウ(Spodoptera litura)[93]、ハラアカマイマイ(Lymantria fumida)[66]、アメリカシロヒトリ(Hyphantria cunea)[77]、クワゴマダラヒトリ(Spirosoma imparilis)[74]等ではＮＰＶ、また、リンゴコカクモンハマキ(Adoxophyes orana fasciata)[115]、チャのハマキムシ類(Adoxophyes spp.、Homona magnanima)[72,110]、コナガ(Plutella xylostella)[10]ではＧＶによる防除試験が行われ、その有効性が報告されている。現在、海外で広く使用されているウイルス製剤の例としては、ブラジルの大豆害虫 Anticarsia gemmatalisを対象としたＮＰＶ[87]、ヨーロッパのリンゴ害虫コドリンガ(Cydia pomonella)に対するＧＶ[24]、中国のシロチョウ類に対するＧＶ[128]等を挙げることができる。この他、試験は行われたものの十分な効果が得られず実用化には至らなかった例、あるいは、効果はあっても生産技術やコストの問題から商業レベルにのらなかった事例も多い。このため、ウイルス利用による害虫防除の実用化推進には、防除効果を安定、向上させるとともに生産技術を改良して低コスト化を図ることが重要と考えられる。

1960年代から70年代にかけて、日本においても罹病害虫からの天敵微生物の分離・同定の研究が活発に行われたが、北海道ではこの分野の研究はほとんど行われなかった。1980年代後半に北海道各地の土壌や昆虫死体を対象に Bacillus thuringiensis (BT)の探索・分離が行われた[70]以外は、昆虫病理学の分野における報告は認められていない。

本研究では、1984年以来数年に渡って各種畑作物害虫の死亡原因調査を行い、ウイルスをはじめとする各種病原微生物を分離するとともにその性状を解析し、病原微生物が害虫の死亡に大きな影響を与えていることを明らかにした[43,45]。特に、北海道では、シロモンヤガ(Xestia c-nigrum)並びにガンマキンウワバ(Autographa gamma)においてＧＶによる流行病がしばしば発生し、個体群変動の要因となっていることを明らかにするとともに、さらにに７種の害虫においてもＧＶ感染による病気の存在を確認した。この調査により分離されたＧＶは、走査電子顕微鏡（ＳＥＭ）

を用いた形態観察による分類が不可能であったため、分子生物学的手法によって検討を行った。その結果、数種のヤガ科昆虫から個体別に分離されたＧＶが、同一ウイルスの変異株として位置づけられることが明らかになった。そこで、それらＧＶの物理的地図を作成することにより、遺伝子変異に関する詳細な解析を行った[42]。また、物理的地図の基準点となる顆粒体タンパク質遺伝子のクローニングとその塩基配列の決定を行い、多種ＧＶと比較検討した。また、シロモンヤガから分離されたＧＶ（ＸｃＧＶ）がＮＰＶに対して感染力増強作用を持つことを見いだし、その活性物質を単離・精製し、その性状を明らかにした。本研究ではこれらの詳細について報告する。

謝　辞

本論文の作成にあたって、常にご懇篤なご指導とご支援を賜りました北海道大学農学部応用生命科学科応用分子昆虫学講座教授　飯塚敏彦博士に深甚なる謝意を表します。本文のご校閲と適切なご教示を賜りました同学部生物資源科学科植物ウイルス病学講座教授　木村郁夫博士、同学科昆虫体系学講座教授　高木貞夫博士に深謝いたします。また、有益なご指導ご助言を賜りました北海道大学農学部名誉教授　中島敏夫博士、九州大学農学部教授　河原畑勇博士、カリフォルニア大学デービス校准教授　前田進博士に感謝の意を表します。

農林水産省農業研究センター病害虫防除部長　稲葉忠興博士、農業環境技術研究所環境管理官　岡田斉夫博士には、本研究の必要性と意義にご理解をいただきご支援いただいた。農業研究センター病害虫防除部水田虫害研究室長　平井一男博士、野菜・茶業試験場茶栽培部元虫害研究室長　本間健平博士、国際農業研究センター畜産草地部長　早川博文博士、農業環境技術研究所環境生物部昆虫行動研究室長　齊藤修博士、同研究所企画調整部企画科　筒井等氏には、研究の遂行にあたって常にご助言とご協力をいただいた。農業生物資源研究所遺伝資源第一部長　美濃部侑三氏、同研究所分子育種部遺伝子構造研究室　肥後健一博士には、分子生物学的手法のご指導を賜りさらに実験上多大の便宜をはかって頂いた。また、京都工業繊維大学　橋本義文博士には、ＴｎＧＶのクローンを分譲して頂き、ご助言を頂いた。ここにこれらの方々に対して心より厚くお礼申し上げます。

第Ⅱ編　　研究史

1.　ＧＶの探索と病理学的特性研究の歴史

ＧＶの存在は、Paillot(1926)[101]によって初めて報告された。Paillotは、オオモンシロチョウ（Pieris brassicae）とカブラヤガ（Agrotis segetum）で微小な病原による病気を発見し、その病原がカイコの微粒子病とは別個のものであることを示した。Steinhaus(1947)[123]はヤガ科のPeridroma margaritosaで顆粒状の封入体を持つウイルス病を発見し、この病原がＮＰＶや封入体非形成のウイルスとは異なる新しいグループに属することを示唆した。ついでBergold(1948)[11]は、ハマキガ亜科Choristoneura murinanaの罹病虫の体内に存在する顆粒状の物体の内部に棒状のvirionが存在することを電子顕微鏡で観察し、これが病原であることを確認した。Bergoldは、この病気をウイルス病であると推定し、病原である顆粒状の封入体を"viruskapseln"と命名し、これによって起きる病気を"kapselvirus-krankheit"と呼んだ。しかし、Steinhaus(1949)[124]は、研究者によって異なる名称で呼ばれていた顆粒病ウイルスに対して"granulosis"という名称を提唱し、その後この名称が広く使われるようになった。

この後のＧＶに関する研究は、Tanada(1953,1956)[129,130]のハワイにおける研究に端を発し、1950年代以降にＧＶが分離された宿主数は徐々に増え、1980年の時点で150昆虫種を数えるに至った[83]。しかしながら、ＮＰＶに比較するとＧＶの分離例は少ない。これは、ＧＶの封入体が光学顕微鏡で観察し得る限界値に近い0.5μmと非常に小さいこと[1]や、宿主域が鱗翅目に限られている[24]ことなどが影響しているためであると考えられる。

日本においては北島(1938)[71]によるモンシロチョウ（Pieris rapae crucivora）幼虫の脂肪病に関する研究が、顆粒病による感染の最初の報告である。北島は、このウイルス病がPaillot(1926)[101]の報告した病気に非常に類似していることを指摘している。この報告は世界的に見てもＧＶ研究の歴史における早い時期に行われたものと言えるが、その後の日本におけるＧＶの研究は、河原畑(1963)[68]による同種の顆粒病の研究が行われるまでは空白状態であった。福原ら(1966)[57]の報告によると、日本ではアトボシハマキ(Hoshinoa longicellana)、ニカメイガ(Chilo

suppressalis)、アワヨトウ(Mythimna (=Pseudaletia) separata)、コカクモンハマキ、モンシロチョウの５種鱗翅目害虫からＧＶが分離され、外国でウイルス病が発見されている昆虫のうち同種や亜種が日本に分布しているものを含めると、ＧＶが確認された日本産昆虫は９種であった。この後、コブノメイガ（Cnaphalocrocis medinalis)やコナガなどからもＧＶが分離され、最近作成された「日本産昆虫の天敵微生物目録」によるとＧＶが発見された昆虫種は35種にのぼる[76]。

病原ウイルスの探索は1960～70年代に盛んに行われてきたが、近年は病原微生物の探索を目的とする研究は減少し、病原ウイルスが新たに報告されることも少なくなってきた。しかしながら、過去に病原の探索や、リスト作成が行われた害虫はいわゆる「重要害虫」を中心としたごく一部の害虫に過ぎず、探索が行われた地域も限られている。今後、広く探索が行われれば、これまで対象外であった害虫のみならず、過去に研究の行われた害虫からも新たに病原ウイルスが発見される可能性は高いものと思われる。

ＧＶの増殖に関する研究は、感染・増殖に適した培養細胞系が確立されなかったために、ほとんどの場合個体を用いて行われている[21, 24]。ＧＶは、ＮＰＶと同じく口から宿主体内に入り、中腸でアルカリ性の消化液によって封入体が溶解することにより放出されたウイルス粒子が中腸上皮細胞を通して侵入する。侵入、感染、増殖に関する研究は、1970～80年代に電子顕微鏡を用いて詳しく行われた[46]。同時期に培養細胞系での実験が試みられたが[47]、ＧＶが増殖可能な細胞系の作出は難しく、培養細胞系の樹立は1990年代に入るまで成功しなかった。現在でも、実験系として確立しているのはコドリンガ細胞とＣｐＧＶを用いた系のみである[149]。

昆虫ウイルスでは、古くから分離宿主の種名を基に命名記載する方式がとられてきたが、ＧＶにおいても長い間この命名方式が採用されてきた。しかし、ウイルスと宿主の関係は必ずしも１対１対応ではなく、同一ウイルスが複数種の宿主昆虫から分離されたり、複数の異なるウイルスが同一種の宿主から分離される場合もある。いわゆる「古典的命名法」ではこれらの事例に十分な対応をすることができないことが指摘され、ＮＰＶの分野では遺伝子解析の重要性が主張されるようになった[16, 102, 117]。他方ＧＶでは、過去の接種実験に関する論文[29, 60]に基づき「ＧＶ

の宿主域は狭い」との考えが一般化しており、また、過去に発見されたＧＶで数属にまたがる宿主域を持つような例がほとんどなかったために、この命名方式を再検討する動きはそれほど強くなかった。しかし、顆粒体とウイルス粒子の形はいずれのＧＶでもほぼ同一であり、その大きさの差異も小さい[1]ため、形態や大きさからＧＶを分類することは非常に困難であった。また、同一宿主から異なる２つのタイプのＧＶが分離された例[136]、多種類の宿主に感染力を持つＧＶが分離された例[36, 138]あるいは、異種宿主から分離されたＧＶが遺伝子的に非常に近縁であることが明らかにされた例[22]も報告されるようになり、ＮＰＶと同様にＧＶでも分類体系の明確化が求められるようになった[24, 37]。生物検定に加え、血清学的手法、化学的手法などが導入されるようになり、1970年代からポリアクリルアミドゲル電気泳動法（ＰＡＧＥ）やペプチドマッピング等による顆粒体並びにウイルス粒子のタンパク質構成の比較や顆粒体タンパク質（granulin)の分子量測定[9, 22, 53, 84, 127, 150, 151, 152, 154]、さらに血清学的手法の活用が試みられた[20, 22, 28, 53, 118, 126, 154]。これらの手法が確立されることにより、ＧＶの分類・同定はある程度可能になったが、相互の近縁性の検討や同一ウイルスにおける変異株間の識別は依然困難であった。

2. ＧＶの遺伝子解析の歴史

ＧＶの遺伝子解析は、ＮＰＶとほぼ同じ時期にウイルスゲノムＤＮＡの制限酵素切断（ＲＥＮ）パターン解析から始まった。Smith & Summers(1978)[116]は、ＮＰＶと共にＧＶのＲＥＮパターンを報告している。この時供試されたウイルスはＮＰＶが７種でＧＶは２種であった。その後、ＮＰＶでは培養細胞系を用いた実験が盛んに行われ、ウイルスのプラーク純化、ゲノムライブラリーやｃＤＮＡライブラリーの作成、制限酵素切断地図の作成、感染時期別の発現遺伝子の検出に加え、多角体タンパク質(polyhedrin)遺伝子をはじめとする多数の遺伝子で塩基配列が決定されるなど遺伝子解析の分野ではめざましい成果が得られた[15, 107]。一方、ＧＶでは、ウイルスの感染・増殖に適した培養細胞系が得られず、遺伝子解析もＮＰＶに遅れをとる結果となった。初期のＧＶの遺伝子解析の研究としては、Tweeten et

al.(1980)[142]によるPlodia interpunctellaＧＶ（ＰｉＧＶ）とPieris rapaeＧＶのBam ＨＩ、HindⅢ、Eco Ｒ Ｉ切断パターンと各切断片の分子量の報告や、Crook (1981)[22]のPieris brassicaeＧＶ（ＰｂＧＶ）とP. rapaeＧＶのＲＥＮパターン比較、Crook et al.(1982)[25]のLacanobia oleraceaＧＶ、Cattano & Langridge (1982)[18]のEstigmene acreaＧＶのＲＥＮパターンの報告等を挙げることができる。Crook et al.(1985)[27]は、ＣｐＧＶとその変異株を対象にＧＶでは初めて制限酵素切断地図を作成し、メキシコ、ドイツ、ロシアからそれぞれ分離されたＧＶのＲＥＮパターン比較や、サザンブロットハイブリダイゼーション法によるゲノムのホモロジーの検討を行った。一方、Harvey & Tanada(1985)[52]は、ハワイ州とオレゴン州でそれぞれP. unipunctaから分離されたＧＶ（ＰｕＧＶＨとＰｕＧＶＯ）並びに、この宿主に交差感染することが知られているScotogramma trifoliiＧＶ（ＳｔＧＶ）の３種を用いてＲＥＮパターン比較とＤＮＡハイブリダイゼーションを行い、ＰｕＧＶＨ、ＰｕＧＶＯ並びにＳｔＧＶのＲＥＮパターンは異なること、ＰｕＧＶＨとＰｕＧＶＯのゲノムのホモロジーは低いが、ＰｕＧＶＨとＳｔＧＶのホモロジーはやや高いことなどを明らかにした。この報告は、同一宿主から分離された２つのＧＶ株が遺伝的に全く異なるウイルスであることを示した初めての例であった。同時期にTrichoplusia niＧＶ（ＴｎＧＶ）の顆粒体タンパク質(granulin)をコードする遺伝子がOrgyia pseudtsugataのＮＰＶ（ＯｐＮＰＶ）のpolyhedrin遺伝子をプローブに用いたハイブリダイゼーションで同定され、ＧＶの遺伝子としては初めてクローニングと塩基配列決定が行われた[3]。その後、ＰｂＧＶのgranulin遺伝子の塩基配列が決定され、Autographa californicaＮＰＶ（ＡｃＮＰＶ）のpolyhedrin並びにＴｎＧＶのgranulin遺伝子との比較が行われた[19]。この他、世界各地でP. brassicaeと Artogeia（=Pieris）rapaeからそれぞれ分離されたＧＶ（ＰｂＧＶとＡｒＧＶ）のＲＥＮパターンの比較が行われ、これらＧＶは同一ウイルス（ＡｒＧＶ）の遺伝的変異株として位置づけられると共に、３つのサブタイプに分類された[23, 120]。また、Smith & Crook(1988)[121]は、幼虫を用いて低濃度のウイルス接種を繰り返すことによって、in vivoでＧＶを純化することが可能であることを明らかにし、得られた純化ウイルスの制限酵素切断地図を作成して、純化株間の遺伝子

変異の解析を行った。この他、現在までに、Choristoneura属の３種から分離されたＧＶ[9]や、Chilo infuscatellusとC. saccariphagus indicusのＧＶ等[33]、同属異種宿主から分離された各ＧＶのＲＥＮパターン比較が行われ類縁性等が検討された。なお、これまでに上記のＣｐＧＶとＡｒＧＶ[27, 32, 120]、筆者らによるシロモンヤガ等６種ヤガ類から分離されたＧＶ[42]、Cryptophlebia leucotretaＧＶ[65]、そしてカブラヤガ(Agrotis segetum)ＧＶ[105]の５組のＧＶについて制限酵素切断地図が報告されている。また、これまでに塩基配列が決定され報告されたＧＶの遺伝子は、前述の granulin遺伝子の他、ＴｎＧＶのウイルス感染力増強因子(virus enhancing factor: VEF)[54]、そしてＡｃＮＰＶのｐ35遺伝子欠損株を用いたマーカーレスキュー法で特定されたＣｐＧＶのアポトーシス阻止遺伝子（ｉａｐ遺伝子）[26]のみとなっている。

3. ＧＶのＮＰＶ感染力増強作用に関する研究史

害虫防除におけるウイルスの実用化を進める上で、感染力の強化は重要な課題である。防除効果の向上を目的にウイルスの感染力を強める物質の探索が行われ、ほう酸[113]、レシチン[139]の他、陽イオン性界面活性剤[153]の添加によってＮＰＶの感染力が上昇する、あるいは致死日数が短縮するなどの効果が得られることが報告されている。このような化合物以外では、アワヨトウの近縁種 P. unipunctaからハワイで分離されたＧＶ（ＰｕＧＶＨ）がＮＰＶの感染力を強化することが知られている。Tanada(1956, 1959)[130, 132]は、ＰｕＧＶＨとＮＰＶを幼虫に混合接種するとＮＰＶの感染率が上昇することを見いだし、この作用を"synergism"「共働作用」と名づけた。Tanada & Omi(1974)[138]は、ＰｕＧＶＨの他、ヤガ科の数種から分離されたＧＶでも共働作用が認められたことを報告したが、この後、Derksen & Granados(1988)[30]がＴｎＧＶで同様の作用を確認するまでは、ＧＶの感染力増強に関する研究はTanadaのグループ以外では全く行われず、研究者の間ではこの現象を「特殊な例」と見る向きがあった。

1970年代には、カラムクロマトグラフィーで活性成分である"synergistic factor"（ＳＦ）を顆粒体から精製する試みがなされ[135, 137, 138]、Hara et al.(1976)

[50]によって単一のタンパク質として精製された。また、ＳＦの生化学的性質の解明が行われ、分子量の測定[50, 151]、至適ｐＨの測定[50, 135]、アミノ酸組成の解析[50, 135, 150]、各種タンパク質分解酵素処理が活性に与える影響[50, 151]等が調べられた。Tanada et al.(1975)[134]は、P. unipuncta幼虫にＮＰＶと共にＳＦを与えた場合、中腸のミクロビリー周辺細胞の細胞膜へのＮＰＶ粒子の吸着数が著しく増大することを透過型電子顕微鏡で観察し、ＳＦがウイルス粒子と細胞の吸着を助ける働きをしていることを示唆した。彼らは、ＳＦを幼虫に経口接種しても囲食膜を含めた中腸組織には、特に変化が認められなかったことを報告している。この後の一連の生化学的解析によって、ＳＦの活性にはリン脂質成分が不可欠であることが明らかにされた[151, 153]。一方、Oba & Tanada(1983, 1984)[90, 91]は培養細胞系を用いた実験を行い、in vitroでもＳＦがＮＰＶの感染力を増大する作用を示すことを確認した。ＳＦはヨトウガ(Mamestra brassicae)、アワヨトウ、Spodoptera frugiperdaなど特定の培養細胞に吸着する性質を持ち、ＳＦの添加によって細胞の凝集が起きることが明らかにされた[92]。Uchima et al.(1988, 1989)[144, 143]は、電子顕微鏡や抗体を用いて作用機構の解明を進め、ＳＦには２つの異なる結合部位があり一方は細胞膜ともう一方はウイルスのエンベロープと結合し、両者を接着する役割をしているとの説を発表した。Hukuhara & Zhu(1989)[59]は、蛍光抗体法を用いた電子顕微鏡的観察を行いこの説を裏付ける結果を報告している。

Lowe & Paschke(1968 a, b)[81, 82]は、T. ni幼虫を用いてＴｎＧＶとＮＰＶの混合接種実験を行い、２種ウイルス間には"synergism"と"interference"のいずれの作用も観察されなかったと報告した。他方、Derksen & Granados(1988)[30]は、ＴｎＧＶの顆粒体をT. ni幼虫に経口接種すると囲食膜の構造が大きく変化することを観察し、さらにＴｎＧＶの顆粒体アルカリ可溶性成分がＮＰＶ感染力を増強する作用を持つことを報告した。彼らは、顆粒体の構成成分が囲食膜を崩壊するためＮＰＶをはじめとする病原微生物の中腸細胞への侵入が助長され感染率が高まるという仮説を提示し、ＴｎＧＶのウイルス感染力増強作用の活性物質を"virus enhancing factor"（ＶＥＦ）と名づけた。また、Gallo et al.(1991)[39]は、T. ni幼虫を用いた接種実験を行いＴｎＧＶのＶＥＦが数種のＮＰＶの感染力を強化する効果を持

つことを報告している。Hashimoto et al.(1991)[54]はＶＥＦを含む成分に対する抗体と発現ベクターを用いてＴｎＧＶゲノムＤＮＡからＶＥＦ遺伝子を特定し、その塩基配列を決定した。ＴｎＧＶとＰｕＧＶＨのＲＥＮパターンには共通するフラグメントが多く、これら２つのＧＶの近縁性は高いものと推定されるが、TanadaとGranados双方の研究グループがそれぞれのＧＶのＮＰＶ感染力増強作用の機構について全く異なる説を唱えている点は非常に興味深い。

Goto(1990)[41]は、GranadosのグループのＴｎＧＶの報告とほぼ同時期に、ＸｃＧＶがやはりＮＰＶの感染力を増強する作用を持つことを発見した。ＸｃＧＶは、ＰｕＧＶＨ、ＴｎＧＶとは異なるＲＥＮパターンを示し、宿主域や感染力の強さも異なることから、これら３種ＧＶの比較研究は、ＮＰＶ感染力増強作用の解明に役立つものと期待される。アメリカで分離されたＰｕＧＶＨとＴｎＧＶ、そして新たに日本で分離されたＸｃＧＶにもＮＰＶ感染力増強作用が発見されたことで、この作用に対するバキュロウイルス研究者の関心は高まりつつある。今後は、遺伝子工学の技術を活用して、感染力増強物質遺伝子を導入した組換え体ＮＰＶの開発や大量生産した感染力増強物質を添加剤として用いた新しいＮＰＶ製剤等の開発が進むものと期待される。

第Ⅲ編　実験の部

第１章　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

第１節　目的

昆虫病原微生物は、人畜など防除目的外生物への害が少ない、化学合成殺虫剤を含む他の防除素材との併用が可能、比較的長期間の貯蔵が可能などの点から、生物的防除法における有力な素材として期待されている[75]。しかし、個々の害虫についてどのような病原微生物が存在し、それが個体数の変動にどのような影響を与えているかを調査した例は少ない。生態学的調査の一環として、各種害虫で生命表が作成されているが、病原微生物による死亡が全く記述されていないものもあり、昆虫の病気が死亡原因として十分に認識されているとは言えない。昆虫病理学的な知識を持った研究者が少ないことも、わが国における昆虫個体群動態の研究で病気の影響があまり考慮されずに来た原因の一つであると考えられる。

わが国における昆虫病原微生物の探索は1930年代に林業害虫の分野で始められ、その後、農業害虫についても行われるようになった。日本産昆虫のウイルス病の目録は福原ら(1966)[57]によって初めて作成され、ウイルス病の存在が認められた宿主として55種が記載された。病気の種類別にみるとＮＰＶは鱗翅目44種、鞘翅目１種、膜翅目３種から、細胞質多角体病ウイルス（ＣＰＶ）は鱗翅目10種から、ＧＶは鱗翅目５種から発見されている（この目録には、外国でウイルス病が発見されている昆虫のうち同種や亜種が日本に分布しているものも含まれている）。最近、国見(1993)[76]は、1992年６月までに発表された論文を基に「日本産昆虫の天敵微生物目録」を作成した。この目録によると、ウイルス病が認められた昆虫は131種で、25年間で２倍以上に増えており、ＮＰＶは104種、ＣＰＶは４８種、ＧＶは35種の昆虫から発見されている。

畑作物害虫に関する研究では、ハスモンヨトウのＮＰＶによる防除が実用段階に到達している[93]のをはじめ、ヨトウガのＮＰＶ[5]、コナガ[10]やモンシロチョウ[4]のＧＶによる防除試験も行われており、チャやリンゴのコカクモンハマキ類[72, 110, 115]やクワのクワゴマダラヒトリ[74]でもウイルス利用による害虫防除の実用化が進められている。しかしながら、これまでに、病原微生物の探索が行われた害

虫の種類、地域には片寄りがありその範囲もごく狭い。したがって、今後の昆虫病原微生物の調査・探索によって新たな防除素材が発見される可能性は高い。特に北海道では、害虫相が本州以南とは異なることから、その病原微生物相も本州とは異なることが予想される。また、これまでにＢＴのスクリーニング[70]以外の病原微生物探索は行われておらず、北海道で新しい病原微生物が発見される可能性は更に大きいものと思われる。

そこで本研究では、畑作害虫のうちでも発生量が多く化学合成殺虫剤による定期的防除が行われているヨトウムシ類を主対象に、天敵微生物の探索と生態解明など微生物的防除法開発のための基礎的研究を行った。

第２節　実験材料および方法

1.幼虫の採集と飼育

北海道河西郡芽室町の農林水産省北海道農業試験場畑作部（現　同試験場畑作研究センター）内の圃場並びに同町内の農家圃場を対象に、テンサイ、ダイズ、トウモロコシ圃場並びにクローバとアルファルファ草地で害虫の発生調査を行い、幼虫の採集並びに病原微生物による死亡個体の探索を行った。調査に供試した害虫名と主な加害作物は、Table 1 に示した。

ヤガ科昆虫は主に中齢幼虫を採集し、ろ紙を敷いた９ｃｍシャーレで個体別に飼育して、発育状態、外観の変化を毎日調べ、生死、寄生性昆虫の有無を記録した。シロモンヤガ、ガンマキンウワバ、ヨトウガ等テンサイを食害する種にはヨトウガ用人工飼料[44]を、アワヨトウにはハスモンヨトウ用人工飼料[94]を、トウモロコシ害虫とツメクサガについてはそれぞれの食草を与えた。なお、トウモロコシ害虫については、筒井ら(1985)[140]の調査で採集され、飼育中に死亡した個体を-20℃で冷凍保存しておいたサンプルも併せて供試した。

マメシンクイガは、収穫期前に刈り取ったダイズを網袋に入れて釣り下げ、莢か

Table 1. Insect pests collected for isolation of natural patogen

Insect species	Food plants
Autographa gamma	beet, cruciferae
Aletia pallens	corn
Amphipoea ussuriensis	corn
Celaena leucostigma	corn
Heliothis maritima	alfalfa, soybean
Hydraecia amurensis	corn
Mamestra brassicae	beet, cruciferae
Mesapamea concinnata	corn, wheat
Mythimna separata	corn, rice, wheat
Sarcopolia illoba	alfalfa, beet, onion
Xestia c-nigrum	alfalfa, beet, potato
Leguminivora glycinivorella	soybean
Plutella xylostella	cruciferae
Colias erate poliographus	alfalfa, soybean

ら脱出してきた老熟幼虫を集めて供試した。老熟幼虫は火山灰土（砂状軽石降下物）を入れた容器中で土マユを形成させ、土マユをシャーレに納めて定期的に観察した。

2.病原微生物の分離・同定

死亡個体は、外観によって大まかに分類し、病原微生物による死亡の可能性があるものについては以下のように処理した。硬化の認められたものは糸状菌病による死亡の可能性が高いのでろ紙を敷いたシャーレに入れて胞子形成を待ち、分生子が形成された場合はラクトフェノールコットンブルー液で固定し光学顕微鏡観察を行うと共にジャガイモ寒天培地、サブロー寒天培地、または根本の培地[89]を用いて純粋分離を試みた。不完全菌類は蚕糸・昆虫農業技術研究所河上　清博士、疫病菌類は森林総合研究所島津光明博士に依頼し同定していただいた。他方、軟化あるいは体内容物の液状化が認められた死体は、塗抹法によりプレパラートを作製し、位相差顕微鏡観察を行って顆粒体並びに多角体の有無を調べた。多角体の存在が認められたサンプルは、1M NaOHをカバーグラスの端から滴下し多角体が溶解する状態を観察してＮＰＶとＣＰＶを判別した。ＮＰＶはアルカリ溶解の過程で"polyhedron membrane"[51]が多角体内部のタンパク質よりも遅れて溶解するため[62, 104, 125]、溶け残った膜が影のような像となり、その中でビリオンが激しくブラウン運動するのが観察される[103]のに対して、ＣＰＶは角砂糖を水に溶かしたときのように周りからくずれるように溶解することを目安に両者を識別した。なお、光学顕微鏡観察で多数の細菌が認められた個体もあったが、病原細菌による死亡であるかあるいは死亡後に二次的な細菌の増殖があったのかを区別することが困難であったので、本実験ではこれらの個体は死亡原因不明として扱った。

3.電子顕微鏡によるウイルスの形態観察

ＮＰＶ、ＧＶ並びにＣＰＶについては、病死虫体から分離精製した封入体の走査型電子顕微鏡（ＳＥＭ）による観察、並びに封入体をアルカリ溶解して得られたウイルス粒子の透過型電子顕微鏡（ＥＭ）による観察を行った。

封入体の精製は、感染幼虫に蒸留水を加えテフロンホモジナイザーで磨砕、ガー

ゼでろ過し、低速遠心処理（600 g、10分）後沈澱した封入体を10 mM Tris-HCl(pH 8.0)で２回、蒸留水で１回洗浄し粗精製試料としたものをショ糖密度勾配遠心法（50～65%(W/V)）で分画し、蒸留水で２回洗浄して行った。精製した封入体は炭素・金蒸着を行って走査型電子顕微鏡（日本電子 JSM-SI）で検鏡した。

ウイルス粒子の調整は、精製封入体をアルカリ液(0.25M NaCl + 0.15M Na_2CO_3 (pH 11.3)）に約20mg／mlになるように加え、溶解処理後、高速遠心処理（15,000 g、2時間）し蒸留水で洗浄して行った。ウイルス粒子の試料は dipping 法を用いて作成し、２％ リンタングステン酸（PTA）pH 6.0 により染色、あるいは１％ グルタールアルデヒドで固定後蒸留水で洗浄し、２％ 酢酸ウラニル（UA)pH 4.5 で染色後、透過型電子顕微鏡（日本電子 JEM 100S）により観察した。

第３節　結果

北海道における畑作物害虫11種を対象に行った病原微生物調査の結果はTable 2に示した。これらの天敵微生物のうち、ＮＰＶは４種、ＧＶは８種、ＣＰＶは３種、緑彊病菌(Nomuraea rileyi)は３種、黄彊病菌(Paecilomyces farinosus)は４種、疫病菌(Entomophaga aulicae)は６種の宿主からそれぞれ分離された。ショウブヨトウ(Amphipoea ussuriensis)、ホシミミヨトウ(Mesapamea concinnata)、モンキチョウ(Colias erate poliographus)の３種はＮＰＶの分離宿主として、シロモンヤガとコナガ(Plutella xylostella)を除くヤガ科５種はＧＶの分離宿主として今回初めて確認された。以下に各病原微生物の特徴について簡単に述べる。

ＮＰＶは、ヤガ科のシロモンヤガ、ショウブヨトウ、ホシミミヨトウの３種並びにモンキチョウから分離された。シロモンヤガから分離されたＮＰＶは、多角体の形態から２種類に分けられ、一方は光学顕微鏡でサイコロ型に見えるタイプ(XcNPV-tetra)、他方は三角形あるいはおむすび型に見えるタイプ(XcNPV-tri)であった。双方のＮＰＶの多角体のＳＥＭ像は、Fig. 1と 2に示した。採集された幼虫から分離されるＮＰＶのほとんどは、XcNPV-tetraタイプのＮＰＶで、XcNPV-triタイプが

Table 2. Insect pathgen isolated in Hokkaido

Insect species	Pathogen
Autographa gamma	CPV GV *Entomophaga aulicae* *Nomuraea rileyi*
Amphipoea ussuriensis	NPV
Aletia pallens	GV
Celaena leucostigma	GV
Heliothis maritima	*Entomophaga aulicae*
Hydraecia amurensis	GV *Paecilomyces farinosus*
Mamestra brassicae	CPV *Entomophaga aulicae* *Nomuraea rileyi* *Paecilomyces farinosus* *Paecilomyces lilacinus*
Mesapamea concinnata	GV NPV
Mythimna separata	GV
Sarcopolia illoba	*Entomophaga aulicae*
Xestia c－nigrum	CPV GV NPV－tri NPV－tetra *Entomophaga aulicae* *Nomuraea rileyi* *Paecilomyces farinosus*
Leguminivora glycinivorella	*Paecilomyces canadensis* *Paecilomyces farinosus* *Paecilomyces fumosoroseus* *Verticillium* sp.
Plutella xylostella	GV
Colias erate poliographus	NPV *Entomophaga aulicae*

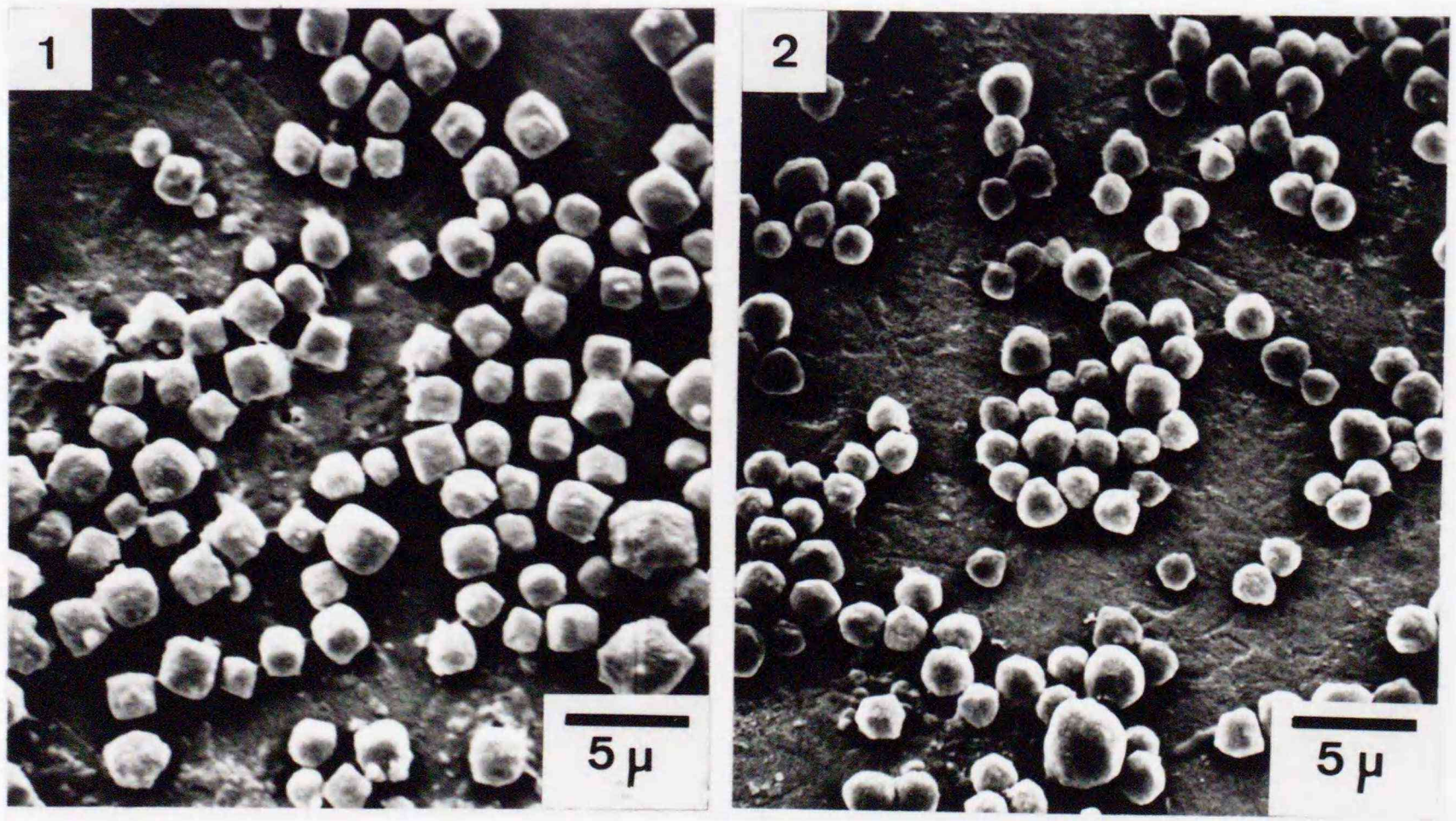


Fig. 1. Scanning electron micrograph of polyhedra of *Xestia c-nigrum* NPV tertagonal type (XcNPV-tetra).
Fig. 2. Scanning electron micrograph of polyhedra of *Xestia c-nigrum* NPV trigonal type (XcNPV-tri).

分離されることはごくまれであった。XcNPV-tetraのＥＭ像は、Fig. 3 に示した。なお、両系統ともビリオン中に複数のヌクレオカプシドが存在する"multiple"タイプのＮＰＶであることがＥＭ観察で確認された。ホシミミヨトウとショウブヨトウから分離されたＮＰＶは、いずれもシロモンヤガに感染性を示し、多角体の形態は、XcNPV-triに類似していた。モンキチョウから分離されたＮＰＶの多角体は、形態的にはXcNPV-triに類似していたが、シロモンヤガには感染性を示さなかったことから上記のヤガ科のＮＰＶとは異なるウイルスであると考えられた。いずれの宿主の場合もＮＰＶ感染幼虫は死亡前に体色がやや白みがかった状態となり、皮膚が脆くなって破れやすくなった。死亡後虫体内容物は速やかに液状になり、黒っぽい色に変わった。モンキチョウでは、植物体の上部に腹脚でぶら下がり逆Ｖ字型になって死亡している個体も観察された（Fig. 4）。

ＧＶは、ヤガ科のシロモンヤガ、ガンマキンウワバ、アワヨトウ、ショウブオオヨトウ(Celaena leucostigma)、タンポキヨトウ(Aletia pallens)、ホシミミヨトウ、フキヨトウ(Hydraecia amurensis)の７種とコナガから分離された。位相差顕微鏡観察によって、ヤガ科から分離されたＧＶの顆粒体はコナガの顆粒体よりも大きいことが確認された。感染幼虫は、ヤガ科幼虫、コナガとも体色の変化が認められ、感染が進むにつれて白っぽくなった。ヤガ科幼虫の場合、感染末期になってもＮＰＶのように皮膚が脆くなることはなく、死亡当日ならばピンセット等でつまんでも皮膚は破れなかった。幼虫は老齢まで生存することが多く、健全個体より大きくなり膨れたような外観を呈した(Fig. 5)。死亡後体内容物は灰色から灰褐色の濃い液状となり、鏡検すると顆粒体が多数存在しているのが観察された。顆粒体のＳＥＭ観察(Fig. 6)並びにウイルス粒子のＥＭ観察の結果、各分離ＧＶは形態的に極めて類似しており、形態のみで判別する事は不可能であった。また、数種のヤガ科から分離されたＧＶについて予備的な感染実験を行ったところ交差感染の可能性が示唆された。そこで、ウイルスＤＮＡの制限酵素切断パターンを調べ、分離ＧＶ間の識別を試みた。この結果については、第２章で詳しく述べる。

ＣＰＶは、ヨトウガ、シロモンヤガ、ガンマキンウワバの３種から分離された。感染幼虫は、いずれの宿主の場合も生育が遅れ、死亡時には体が縮小した。皮膚は



Fig. 3. Electron micrograph of virions and nucleocapsids (arrow) of XcNPV-tetra. Bar = 500 nm.



Fig. 4. *Colias erate poliographus* larva killed by a nuclear polyhedrosis virus, hanging by prolegs from an alfalfa leaf.



Fig. 5. *Autographa gamma* larva infected with a granulosis virus.

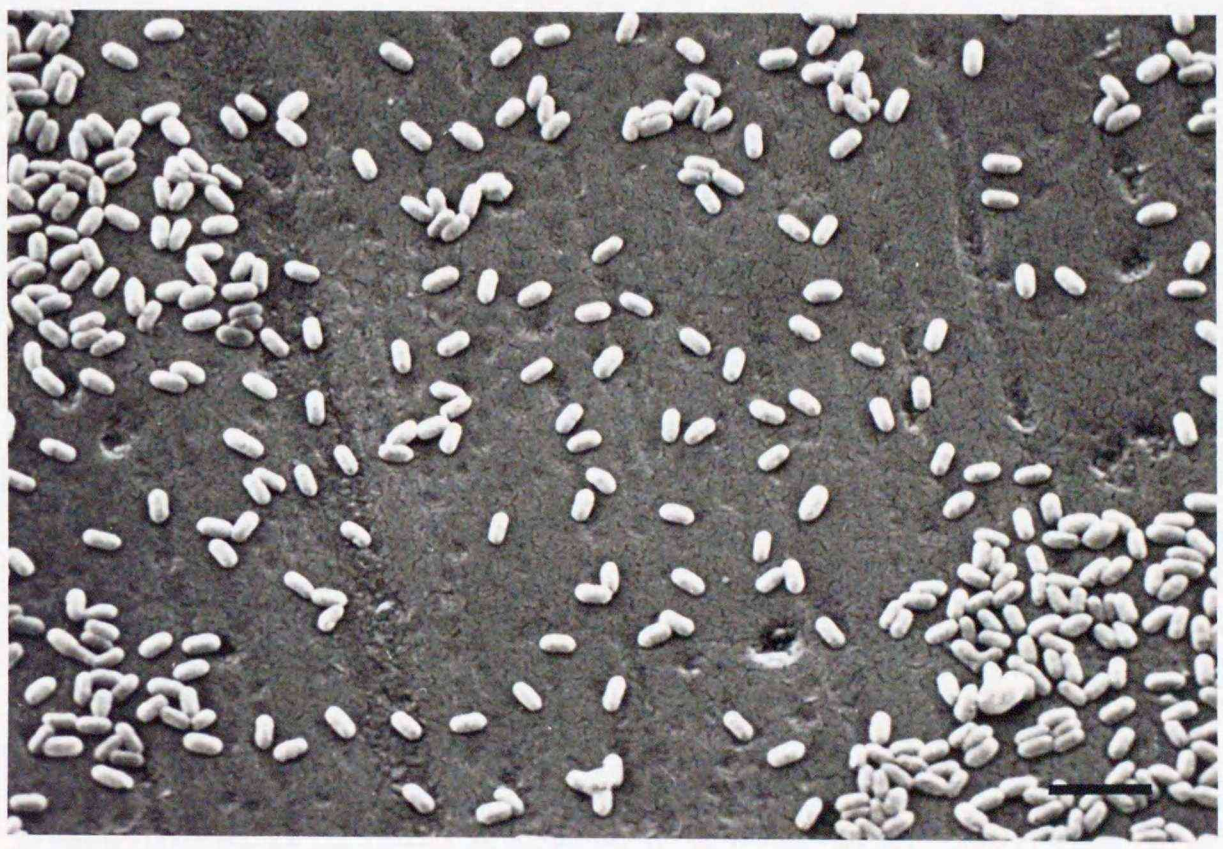


Fig. 6. Scanning electron micrograph of GV capsules isolated from *Autographa gamma* larva. Bar = 2 μm.

脆くはならず、組織も形をとどめているが、中腸は白濁し、鏡検すると外観六角形の多角体が多数存在していた。多角体のＳＥＭ像は、Fig. 7に示した。本研究ではＣＰＶの交差感染の有無については検討しなかった。

なお、シロモンヤガとガンマキンウワバではＧＶとＣＰＶが混合感染している例が認められた。この場合、体内には顆粒体と多角体の双方が形成されていたが、外観はどちらか一方の病徴が強く現れていることが多かった。

次に糸状菌病について述べる。分離された糸状菌のうち不完全菌は、緑彊病菌、黄彊病菌、赤彊病菌(Paecilomyces fumosoroseus)、P. lilacinus、P. canadensis、Verticillium sp.の６種であった。このうち、緑彊病菌は幼虫から、他の５種は蛹から分離された。緑彊病菌で死亡した個体は、死後１日で体表が白い菌糸で覆われ２、３日後には緑色の胞子が形成された。特にシロモンヤガでは、眠期に死亡する個体が多い傾向が認められた。黄彊病菌、赤彊病菌、P. fumosoroseus、P. lilacinus、P. canadensisでは、蛹の節間膜の部分から白色～クリーム色の菌糸が伸長して、体表が部分的に覆われた。P. farinosusでは1～3cmの担子梗束が火炎状に伸長しクリーム色の胞子が形成された。P. canadensisの胞子は鮮やかなオレンジ色を呈していた。P. fumosoroseusの場合は、1cm程度の棍棒状の担子梗束が形成されやや灰色がかったピンク色の胞子が形成された。Verticillium sp.は、担子梗束、胞子とも白色であった。

疫病菌は、1986年4 月にアルファルファ圃場で行った調査の際に、シロモンヤガ越冬幼虫死亡個体において休眠胞子として発見された。胞子は直径29～51μm で大半は30～40μm 程度の厚膜胞子であった(Fig. 8 A)。同年9 月にも同圃場および隣接圃場において、体内に多数の休眠胞子が形成されたシロモンヤガ死亡個体が観察された。胞子の大きさは19～40μm 、平均25μm 程度で、４月に得られた休眠胞子よりもやや小さく、胞子の膜は春期の休眠胞子のような厚膜状には発達していなかった(Fig. 8 B)。死亡個体はやや軟化しており、体内は淡黄色のチーズ状で、乾くと脆くなった。このあと、９月下旬から10月にかけて同圃場とその隣接圃場で、ガンマキンウワバ、ツメクサガ(Heliothis maritima)、ヨトウガ、シロシタヨトウ(Sarcopolia illoba)、モンキチョウが多数発生し、これらの幼虫に疫病菌による流

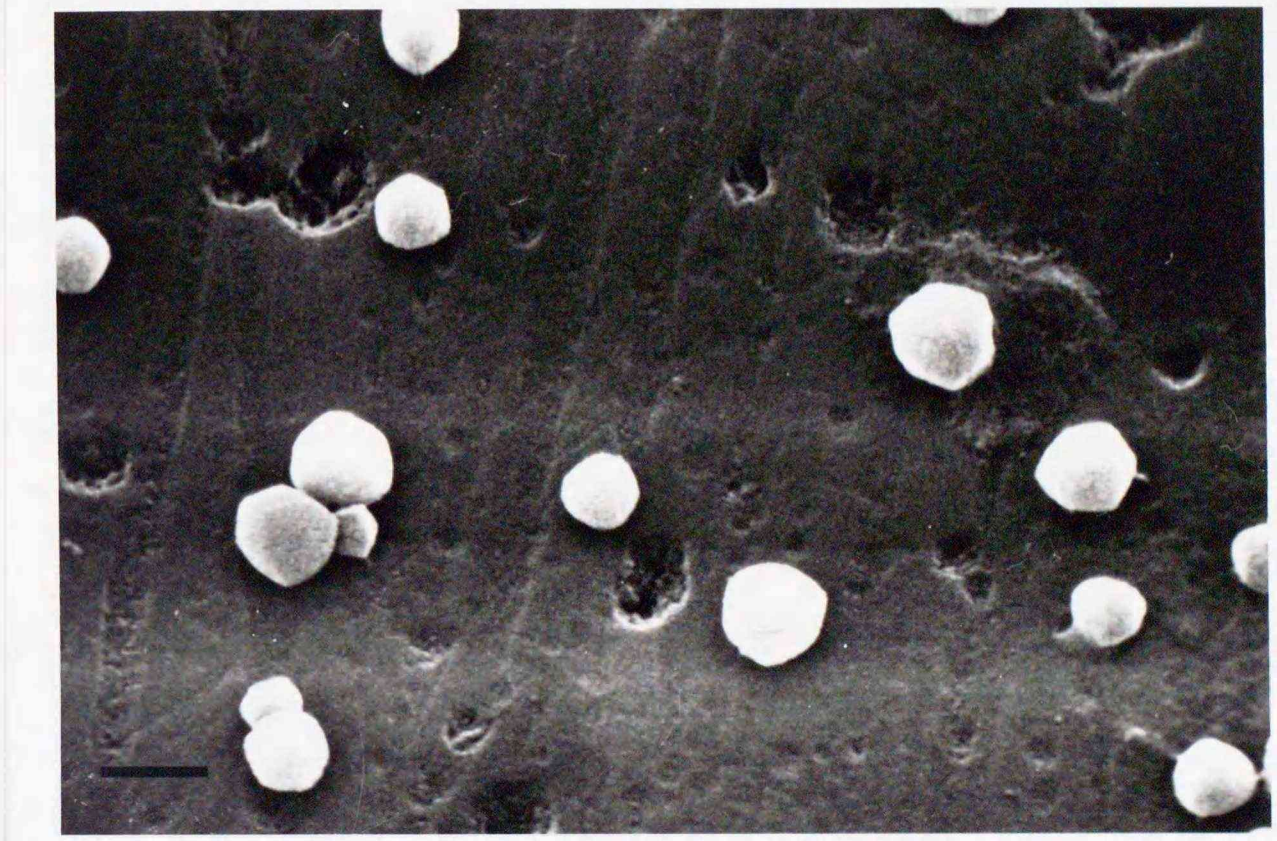


Fig. 7. Scanning electron micrograph of purified polyhedral inclusion bodies of CPV isolated from *Autographa gamma*. Bar = 2 μm.

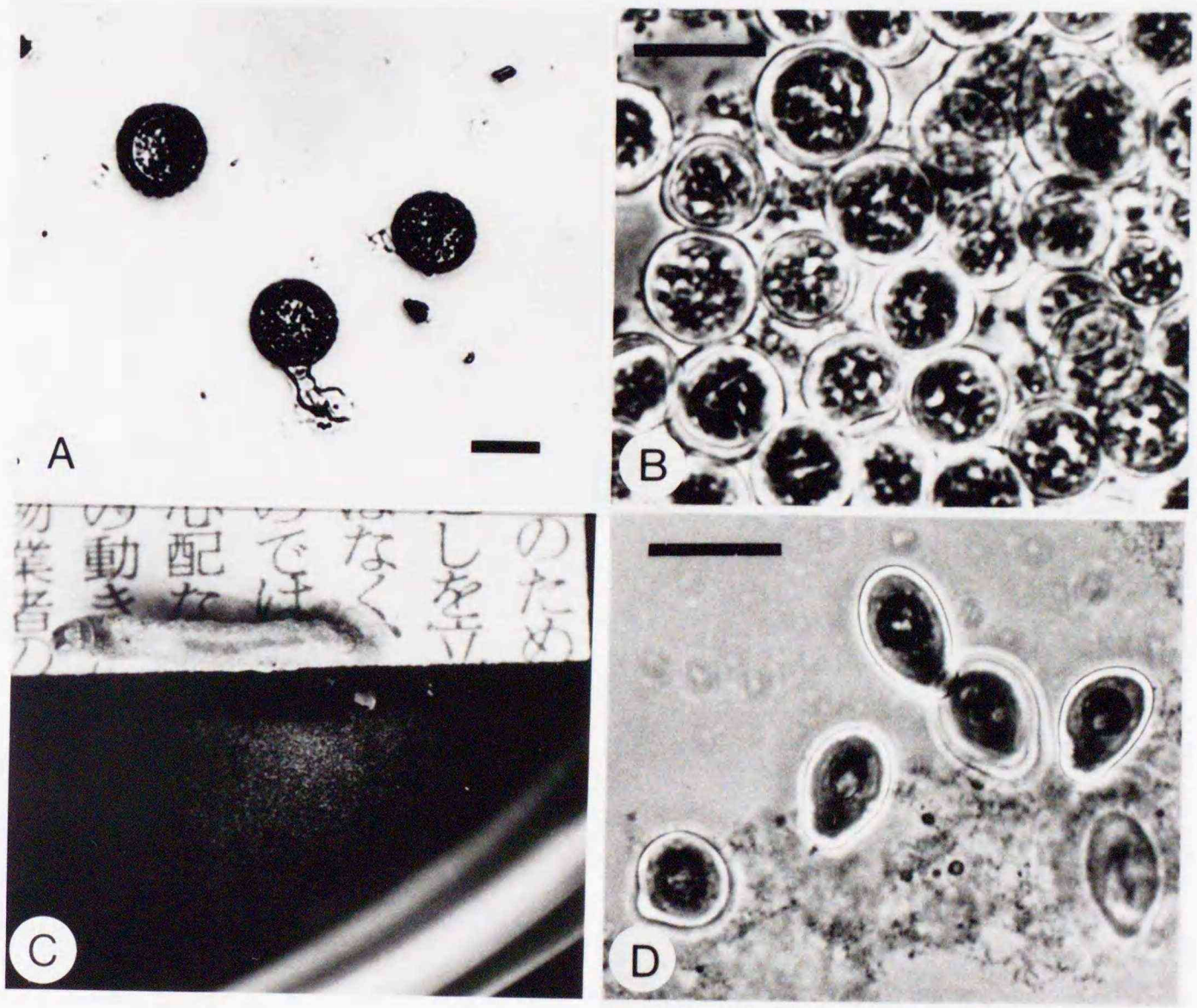


Fig. 8. A: Resting spores of *Entomophaga aulicae* from a larval cadabor in April.; B: Resting spores in September.; C: *Xestia c-nigrum* larva killed by *E. aulicae* and conidia forcibly discharged from the cadabor.; D: Conidia of *E. aulicae*. Bar = 30 μm.

行病が観察された。この疫病菌は分生子の形態からEntomophaga aulicae と同定された。幼虫は疫病菌の感染後期になると植物体の上方に移動し、腹脚でぶら下がるような状態で死亡し、死後数日で虫体は干からびた。死亡直後の外観は健全個体と変わらないが、体内には白色～クリーム色の菌体が充満していた。翌日には体表面に疫病菌の分生子が多数形成され、死体のまわりに飛び散った(Fig. 8 C)。分生子は洋ナシ形で、大きさは20.6±1.33μm × 32.13±2.03 μm(Fig. 8 D)、40倍の実体顕微鏡で容易に観察することができた。圃場では異種害虫で同時期に疫病菌による死亡個体が観察され、アルファルファ１株に数種類の幼虫が寄り集まるようにして死亡している例も観察された(Fig. 9)。

今回、病原微生物の調査を行った害虫の中で、発生数が多く、多数の幼虫を採集・飼育することができたシロモンヤガ、ガンマキンウワバ、ヨトウガ、ホシミミヨトウ、ショウブヨトウについては、各死亡原因ごとの死亡率を調査したので、その結果について以下に述べる。採集幼虫は、中齢幼虫が主体で一部老齢幼虫も供試した。シロモンヤガの1986年秋期の調査並びにヨトウガの1985年７月の調査については、室内飼育虫から採卵した卵をあらかじめ圃場に放飼し、放飼地点の周辺で幼虫の採集を行ったが、それ以外の調査では自然発生の個体を採集して供試した。

シロモンヤガの調査結果は、Table 3 に示した。春期に採集した越冬あけ幼虫では、ウイルス病による死亡率が高く、1984年、1986年ともに40%を越えていた。秋期はウイルス病による死亡率は低く、採集個体にはＮＰＶ感染は認められなかった。緑彊病菌は発生率に変動があるが、採集年、季節に関わらず発生が認められた。1986年春期の調査では死体を含めたシロモンヤガ幼虫の密度は約20個体／㎡であったが生存個体は10%以下で、この調査で得られた死亡個体の80%以上で疫病菌の休眠胞子と菌糸が観察された。同年の秋期は、シロモンヤガ以外のヤガ科幼虫にも疫病菌の流行が観察された。

ガンマキンウワバの調査結果は、Table 4 に示した。テンサイ圃場では病気による死亡率は極端に低く、ガンマキンウワバに限らずシロモンヤガ、ヨトウガの場合もまれに緑彊病菌で死亡した個体が認められた他は病死個体が観察されることはほとんどなかった。ガンマキンウワバは、牧草地ではウイルスによる死亡が多く、死



Fig. 9. Larvae of several noctuid species killed by *Entomophaga aulicae* in an alfalfa field.

Table 3. Motality (%) and cause of death in *Xestia c-nigrum* larvae reared on an artificial diet after collected from fields

Plant in fields	White clover (1984)		Alfalfa (1986)		
Time of collection	March & April	October	April	September	October
No. of individuals	195	130	17	60	45
Healthy	38.5	61.5	0.0	40.0	11.1
NPV	12.3	0.0	35.3	0.0	0.0
GV	11.8	2.3	11.8	0.0	17.8
CPV	2.1	0.8	0.0	0.0	0.0
GV+CPV	12.8	0.0	0.0	1.7	13.3
Nomuraea rileyi	4.1	6.2	0.0	10.0	33.3
Entomophaga sp.	0.0	0.0	29.4	5.0	17.8
other fungi	4.1	0.0	0.0	0.0	0.0
parasitoids	1.5	16.9	5.9	40.0	4.4
unkown	13.3	12.3	23.5	3.3	2.2

Table 4. Mortality(%) and cause of death in *Autographa gamma* larvae reared on an artificial diet after collected from fields

Plants in fields	White clover	Sugar beet	Alfalfa
Time of collection	March & April*	August**	September**
No. of individuals	42	44	59
Healthy	7.1	50.0	33.9
GV	11.9	0.0	1.7
CPV	42.9	0.0	11.9
GV+CPV	16.7	0.0	5.1
Nomuraea rileyi	0.0	2.3	28.8
parasitoids	0.0	47.7	6.8
unknown	21.4	0.0	11.9

*: 1985, **: 1986

亡率は春期には70%以上、秋期でも20%近い値を示した。春期は、特にＣＰＶによる死亡が顕著であった。

ヨトウガの調査結果は、Table 5 に示した。テンサイ圃場では中齢期に採集した幼虫の死亡率は約30%で、死亡原因の主なものは寄生性昆虫であり病原微生物による死亡率は非常に低かった。

トウモロコシ害虫２種の調査結果は、Table 6に示した。この２種はトウモロコシの生育初期に茎内に侵入食害する害虫で、同一圃場内で同時期に発生が認められた。ホシミミヨトウは採集個体数が少なく、その半数以上が健全個体で死亡率は低かった。死亡は寄生性昆虫によるものがほとんどで、少数ながらＧＶとＮＰＶに感染した個体が認められた。ショウブヨトウでも、ホシミミヨトウと同様に寄生性昆虫による死亡率が高く、ＮＰＶによる死亡個体がごく少数認められた。

第４節　考察

今回の調査の結果、13種の害虫から、ウイルスと糸状菌を主体に多数の病原微生物が分離された。供試した種の多くは今まで病理学的な調査の対象として扱われたことがなかったため、今回新たなウイルスを多数発見すると共に、既知の糸状菌についても新たな宿主を確認することができた。一般に、大量の病死虫が観察されるのは害虫の大発生にともなう流行病が起きた場合などで[31, 34, 55, 133, 141]、野外調査の際に死体や罹病虫が観察される機会は少ない。このことからも、野外から多数の幼虫を採集し個別飼育中に得られた死亡個体から微生物を分離する今回の方法は、病原微生物の探索収集方法として効率的であると言える。なお、テンサイなど輪作作物の圃場に比べ、アルファルファやクローバ等の牧草地は害虫の個体数も多く、病気の発生率も高い傾向が認められ、病原微生物探索の場所として適していると思われる。輪作圃場では毎年作付される作物が変わり害虫相や微生物相が変化するのに対し、特定の害虫が数年間連続して発生できる環境にある牧草地は病原微生物の蓄積が多く、病気の発生率も高いものと推定される。

Table 5. Mortality(%) and cause of death in *Mamestra brassicae* larvae reared on an artificial diet after collected from sugar beet fields between 5th to 12th July, 1985.

Causative agent	% of larvae	No. of individuals
Fungal diseases	5.2	8
Parasitic wasps	13.7	21
Parasitic fries	3.9	6
unknown	9.2	14
Healthy	68.0	104
Total	100.0	153

Table 6. Motality (%) and cause of death in *Amphipoea ussuriensis* and *Mesapamea concinnata* larvae collected from corn fields

Insect species	*A. ussuriensis*	*M. concinnata*
No.of individuals	159	32
Healthy	22.6	53.1
GV	0.0	3.1
NPV	2.5	3.1
Fungal diseases	1.3	0.0
Parasitoids	49.1	28.1
unknown	24.5	12.5

モンキチョウやシロシタヨトウについては少数個体の調査しかできなかったが、テンサイやマメ科牧草を加害するシロモンヤガとガンマキンウワバ並びにショウブヨトウなどトウモロコシに加害するヤガ類は、3年以上にわたって多くの個体を採集、個体飼育して、病原微生物の分離を行うことができた。本研究では、若齢幼虫の調査は行わなかったが、中齢以降の幼虫については死亡原因と各原因ごとの死亡率を調べることができた。死亡原因に病原微生物が占める割合は、ショウブヨトウとホシミミヨトウでは低かったが、シロモンヤガとガンマキンウワバでは高く、時期によっては死亡原因の70%以上を病原微生物が占める場合もあった。シロモンヤガではNPVは越冬あけのみに観察されたが、GVは時期によらず発生し、多いときには死亡原因の4割にのぼることが明らかになった。NPVはシロモンヤガで2つのタイプが確認された他、ホシミミヨトウ、ショウブヨトウ、モンキチョウからも分離されており、このうちシロモンヤガのNPVについては、Iizuka et al. (1987)[64]がウイルスゲノムDNA制限酵素切断パターンの比較からXcNPV-tetraとXcNPV-triが異なるウイルスであることを確認している。また、ホシミミヨトウとショウブヨトウから別個に分離されたNPVとXcNPV-triは、多角体の形態がよく似ていた。予備実験により、これら3つのNPVのゲノムDNAのEco RI切断パターンの類似性は非常に高いことが明らかになったことから、これらのNPVが同一ウイルスである可能性は高いと思われる（後藤、半田、未発表）。なお、宿主域の違いから、ヤガ科3種から分離されたNPVとモンキチョウ分離NPVは異なるウイルスであると考えられる。シロモンヤガNPVについては、藤村(1976)[38]が融雪後に採集し飼育した幼虫で「核多角体病ウイルスらしい死亡が多数観察される」ことを報告しているが、病理学的な確認は行われていない。

他方、菌類は不完全菌5種と疫病菌1種の計6種が分離された。不完全菌のうち黄彊病菌や緑彊病菌は過去に鱗翅目を中心に多数の昆虫種から分離されており[61,67]、今回の調査でも複数の宿主で感染が確認された。疫病菌は、数種鱗翅目害虫から分離の報告がある[8,48] E. aulicaeと同定され、アルファルファ圃場をはじめ野外では同一種の菌が多種類の宿主に季節を通じて感染している可能性は高いものと思われる。蔬菜など多くの作物の重要な害虫であるヨトウガでは過去に疫病菌の報

告があり、関東地方でEntomophthora grylli[6]が、東北地方ではEntomophthora sp.[95]が分離されている。疫病菌の分類には未確定な部分が残されており、今回の分離菌と過去の分離菌が同じ種に属するかどうかについては今後の検討が必要である。また、1978年から1985年に行われた同地域での越冬幼虫の調査ではこのように春期に大量の病死個体が観察されたことがなかった（筒井、私信）ことを考え合わせると、疫病菌の発生は年次による変動が大きいものと思われる。

ガンマキンウワバ、ショウブオオヨトウ、フキヨトウ、ホシミミヨトウ、タンポキヨトウの５種はＧＶの宿主として記録されたのは初めてであった。このうち、ガンマキンウワバはヨーロッパでは古くから主要な害虫として研究が行われＮＰＶとＣＰＶは既に報告されている[7, 80, 83]が、これまでＧＶは全く発見されておらず、北海道で初めてＧＶが発見された点は非常に興味深い。第２，３章で詳しく述べるが、シロモンヤガ、ガンマキンウワバ、ショウブオオヨトウ、フキヨトウ、タンポキヨトウとアワヨトウの６種から分離されたＧＶは実際は１種類のウイルスであることが感染実験並びに遺伝子解析から明らかにされた。このＧＶは十勝地方で発生量の多い害虫であるシロモンヤガとガンマキンウワバの双方に特に強い病原性を示すが、ガンマキンウワバは日本には1960年代以降に侵入し害虫化したと考えられる[111]ことからＧＶの原宿主である可能性は低いものと思われる。ＧＶの分離宿主のうちアワヨトウは北海道の日本海側では毎年飛来が認められるが、十勝地方では発生が極めてまれな昆虫であり、1987年のような大発生はほどんど報告されていない[96, 97]。アワヨトウでは、過去に北海道、佐賀、奈良でＧＶ感染個体が採集されている[2]が、これらと本研究で発見されたＸｃＧＶとの関係は不明であり、全く別のＧＶが存在する可能性も考えられる。今回得られたアワヨトウのＧＶ感染幼虫は１個体だけであり、シロモンヤガで感染・増殖を繰り返しているウイルスに交差感染したものと考えるのが妥当であろう。

今回確認できた病原微生物のうちで、採集して飼育した幼虫のみならず、野外でも多数の罹病個体や死亡個体が観察されたのは、各種害虫における疫病菌とガンマキンウワバのＧＶであった。報告例の比較的多い疫病菌に比べるとウイルス病、特にＧＶの流行の観察例は極端に少ないといえる。これまで報告されているバキュロ

ウイルスは、その多くが実験室内の飼育昆虫から分離されたものであり、自然界での発生が全く報告されたことがないものも多いことから考えると、今回多数の野外採集幼虫からＮＰＶとＧＶが分離されたことは興味深い。更に、日本では分離例の少ないＧＶが８種の宿主から分離されたことは大きな成果である。日本でこれまでに詳しい研究が行われたＧＶはコナガＧＶ[10]とコカクモンハマキ類ＧＶ[72, 110, 115]のみで、ヤガ類のＧＶは研究蓄積がほとんどない状態である。従って、新たに発見されたＧＶの研究は、防除素材開発の点からも非常に重要である。今回分離されたＧＶは予備実験から交差感染が示唆され、ＧＶとしては広い宿主域を持つと考えられる。また、野外で流行病が観察されたことを考え併せるとその感染力はかなり強いことが期待できる。従って、このＧＶを利用して、複数種のヤガ科害虫を同時防除できる可能性は高いといえる。さらに、このＧＶはＮＰＶとの相互作用、すなわち、感染力増強作用を持つことから、ＮＰＶ製剤化における添加剤としての利用も考えられる。これらを踏まえ、本論文の第２章以降はシロモンヤガ並びに他のヤガ科害虫から分離されたＧＶに論点を絞って、研究結果を述べる。

第２章　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

第１節　目的

バキュロウイルスは、ごく最近まで分離宿主をもとに命名、分類され記載されてきた。しかし、同一宿主から形態的に明らかに異なる複数のウイルスが得られた場合や[64, 136]、あるいは宿主域が広いウイルスが複数の異なる種から分離された場合には混乱が生じるおそれもあり、この方式はウイルスの分類・命名法として不十分であると考えられるようになった[24, 40, 86, 117]。

バキュロウイルスの分類・同定を明確にするために、これまで、血清学的方法、タンパク質電気泳動法など各種の手法が用いられてきた。1980年代に入って、ゲノムＤＮＡの制限酵素切断片電気泳動パターンによる分類法（ＲＥＮ法）が導入され、ＮＰＶについてはこの手法が盛んに使われるようになった[15, 16, 17, 35, 40, 64, 69, 79, 85, 86, 112, 116, 117, 119, 142, 146]が、ＧＶ研究におけるＲＥＮ法の導入はやや遅れた。Crook et al.（1985）[27]は各地域でコドリンガから分離されたＧＶ（ＣｐＧＶ）を用いてＲＥＮ法による解析を行い、ＣｐＧＶでは同一種の宿主から分離されたＧＶ間に遺伝子変異が存在することを明らかにした。また、Smith & Crook(1988)[120]は同法を用いてシロチョウ科の Artogeia(=Pieris) rapae 並びにPieris brassicae から個別に分離されたＧＶ（ＡｒＧＶとＰｂＧＶ）が同一ウイルスの遺伝子的変異株と考えられることを報告している。ＡｒＧＶでは、in vivo純化法を用いて野生株から複数の純化株が得られている[121]。

第１章 Table 2の天敵微生物リストに示したとおり、北海道内では、多種類の害虫からＧＶが分離された。ＧＶはバキュロウイルスの中でも特に宿主特異性が高いという説[29, 60]が定説となっていたため、当初筆者はそれぞれの宿主から異なるＧＶが得られたと考えていた。しかし、罹病幼虫のほとんどは芽室町内の比較的狭い地域から得られていること、また、同一採集地で同時期に複数種の害虫からＧＶが分離された場合もあったことから、交差感染の有無を確認する必要を感じ、予備的な接種試験を行った。その結果、いくつかのＧＶで分離宿主以外の害虫に対する感

染性が確認された。そこで、北海道で4亜科6属6種の害虫から分離されたＧＶを同定し、その類縁関係を明らかにするため、ウイルスゲノムＤＮＡのＲＥＮパターンの比較を行った。その結果、各害虫から分離されたＧＶが同一ウイルスの遺伝子変異株であることが明らかになったので、制限酵素切断地図を作成して、各ウイルス間の詳細な遺伝子変異の解析を行った。

ＮＰＶの遺伝子解析がめざましい進歩を遂げている[15, 107]のに対し、ＧＶの遺伝子解析は遅れており、これまでに遺伝子が特定され塩基配列が決定されたＧＶのタンパク質は、3種類に過ぎない。ＮＰＶの遺伝子の中で初めて塩基配列が決定されたのは封入体タンパク質であるpolyhedrin遺伝子であった[56]が、同様にＧＶで初めて塩基配列が決定された遺伝子はgranulinをコードする遺伝子であった。1985年にＰｂＧＶとＴｎＧＶのgranulin遺伝子の塩基配列が相次いで発表され[3, 19]、数年遅れてＣｐＧＶでも塩基配列決定が行われたが、ＣｐＧＶでは塩基配列の一部が発表された[24]のみで、その他のＧＶではこれ以降報告がない。この他に、塩基配列が報告されている遺伝子は、ＴｎＧＶのＶＥＦ遺伝子[54]とＣｐＧＶのアポトーシス阻害遺伝子[26]だけである。本研究では、ヤガ科数種から分離されたＧＶの制限酵素切断地図を作成するため、地図の零点の基準となるgranulin遺伝子の位置を特定し、これらＧＶの代表としてＸｃＧＶαを用いてgranulin遺伝子の塩基配列を決定した。

本章では北海道で各種害虫から分離されたＧＶの制限酵素切断地図の作成並びに、ＧＶ間の変異解析について述べると共に、ＸｃＧＶと他種ＧＶとのgranulin遺伝子の塩基配列を比較した結果について述べる。

第2節　実験材料および方法

1. ウイルスＤＮＡの抽出

供試ウイルスの由来はTable 7 に示した。

Table 7. Origin of GV isolates

Isolate		Host species	Date of isolation	
XcGV	α	*Xestia c-nigrum*	January	1984
	β		May	1986
	1		November	1984
	2		November	1984
	3		December	1984
	4		May	1984
	5		May	1984
	6		May	1984
	7		May	1984
	8		Novenber	1985
	9		May	1986
	10		May	1986
	11		April	1988
	12		May	1988
AgGV		*Autographa gamma*	September	1985
ApGV		*Aletia pallens*	May	1985
HaGV		*Hydraecia amurensis*	July	1982
ClGV		*Celaena leucostigma*	July	1982
MsGV		*Mythimna separata*	August	1987
PuGVH		*Pseudaletia unipuncta*		

ＧＶ顆粒体は、以下の方法で個体別に精製した。感染死体に蒸留水を加えて磨砕後、ガーゼと脱脂綿で濾過して500gで５分遠心分離し、その上清を10,000gで30分遠心処理した。沈澱を蒸留水に懸濁し、３回遠心洗浄を行い、再度蒸留水に懸濁した後、1,000gで10分遠心分離し、その上清を10,000g30分遠心処理して顆粒体の沈澱を得た。なお、夾雑物が多い場合は、45～60%（w/w）しょ糖密度勾配遠心法を併用した。

精製封入体からのウイルスＤＮＡの抽出は、以下の手順で行った。

①封入体（乾燥重で5mg程度）をマイクロテストチューブに入れ、１mlのアルカリ溶液（0.02M NaOH）で30～60分溶解する。

②卓上小型超遠心機を用いて100,000ｇで15分遠心し、上清を捨てる。

③沈澱を1／2 × ＴＥバッファー（ＴＥ：10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0）に懸濁し、プロティネースＫとＳＤＳをそれぞれ最終濃度が250 μg/mlと0.5%になるように加え、37℃で１時間反応させる。

④ＴＥ飽和フェノールでＤＮＡ抽出を３回繰り返した後、エーテル抽出を行いフェノールを除去する。

⑤エタノール沈澱ならびに70%冷エタノール洗浄後、吸引乾燥する。得られたＤＮＡをRNase（20μg／ml）添加ＴＥに懸濁し、37℃で30分反応させＲＮＡを分解する。得られたＤＮＡ溶液は、必要に応じてエタノール沈澱を行い濃度を調整して、4℃あるいは-20℃で保存する。

2.ＤＮＡの制限酵素による切断

ウイルスゲノムＤＮＡを所定の反応緩衝液に溶解し、ＤＮＡ１μｇに対し制限酵素５～10unitを加え、37℃で２～４時間反応させた。

3.アガロースゲル電気泳動

電気泳動には臭化エチジウム（0.5mg／１）を加えたトリスほう酸バッファー（ＴＢＥ）[109]を用い、アガロース濃度0.5%～1.5%、６～25mA、室温条件下で4～20時間泳動した。トランスイルミネーター上でゲル内のＤＮＡ断片を確認して、ポラロ

イドカメラで撮影し、泳動パターンの解析を行った。なお、分子量マーカーとしてλファージＤＮＡのHindⅢ切断片並びにφX174の HaeⅢ切断片を同時に泳動した。

4.制限酵素切断片のクローニング

ウイルスゲノムＤＮＡを制限酵素Eco R Ⅰあるいは Bam HⅠで消化し、得られた切断片をプラスミド（pBR325（Bethesda Research Laboratories, USA））またはファージミド（BluescriptⅡ（Stratagene, USA））を用いてクローニングした。切断片の一部は、低融点アガロースゲル電気泳動によって単離後クローニングに供試した。得られたクローンの特定は、アガロースゲル電気泳動によるインサートＤＮＡ分子量測定並びにゲノムＤＮＡ制限酵素切断片とのサザンハイブリダイゼーションにより行った。

5.ハイブリダイゼーションによる制限酵素切断地図作成と遺伝子変異の解析

アガロースゲル電気泳動後、サザンブロッティング法[122]によりＤＮＡ切断片をナイロンメンブレンに移行させた。ＤＮＡトランスファーには、アルカリブロッティング溶液（0.25M NaOH＋1.5M NaCl）を用いた。

ウイルスＤＮＡの制限酵素切断片あるいはそのプラスミド／ファージミドクローンをニックトランスレーションキット（宝酒造）または、ランダムプライマーラベリングキット（宝酒造）を用いて^{32}Pで標識してプローブを作成した。ハイブリダイゼーションは、ラピッドハイブリダイゼーションバッファー（アマシャム）を用い、65℃で２～３時間行った。ハイブリダイゼーション後、メンブレンは、２×ＳＳＣ＋ 0.1％ＳＤＳで室温15分振とう２回、１×ＳＳＣ ＋ 0.1％ＳＤＳで65℃10分振とう１回、0.1×ＳＳＣ ＋ 0.1％ＳＤＳで65℃10分間振とう１回をそれぞれ行い洗浄した（ＳＳＣ：150 mM NaCl ＋ 15mM tri-sodium citrate）。風乾後メンブレンをサランラップで被い－20℃でオートラジオグラフィーを行った。

6.ウイルスのin vivo純化

塩基配列の決定には、ＸｃＧＶαをSmith & Crook(1988)[121]の方法に従ってin

vivo純化した株を供試した。すなわち、ＧＶ顆粒体懸濁液を段階希釈して人工飼料に混ぜて、各濃度条件につき20～30個体の幼虫（シロモンヤガあるいはアワヨトウの１～２齢を供試）に摂食させ、感染率が10%以下の区から感染幼虫１個体を選び、死亡後に顆粒体を遠心精製して次の接種源とすることを４回繰り返した。

7.ハイブリダイゼーションによるgranulin遺伝子の特定

ＰｂＧＶとＴｎＧＶのgranulinのコーディング領域の前部・中部・後部から２種ＧＶ間の相同性が高い塩基配列部分を選択し、ＤＮＡ合成機（アプライドバイオシステム）を用いて、約２０ｂｐのオリゴヌクレオチドを合成した。これをγ-^{32}ＰＡＴＰでリン酸化したものをプローブに用い、ＸｃＧＶのゲノムＤＮＡあるいはそのクローンの制限酵素切断サザンブロットとハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションはラピッドハイブリダイゼーションバッファー（アマシャム）を用い、37℃で90分プローブと反応させた後６×ＳＳＣで37℃１時間洗浄し、オートラジオグラフィーによって遺伝子の検出を行った。

また、ＴｎＧＶのゲノムＤＮＡのEco ＲＩ断片のうちgranulin遺伝子を含むEco ＲＩ-Sのプラスミドクローン（京都工芸繊維大学橋本義文博士より分譲）から抽出したＤＮＡをプローブに用い、ＸｃＧＶＤＮＡ制限酵素切断片あるいはそのクローンとのサザンハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションは「5.」と同様の手法で行った。

8.granulin遺伝子の塩基配列決定と遺伝子解析

ＸｃＧＶαのgranulin遺伝子を含むクローン並びにそれをさらに制限酵素処理して得られたサブクローンからアルカリ溶解法で二本鎖ＤＮＡを抽出し、蛍光プライマーシークエンスキット（アプライドバイオシステム）を用いて、ＰＣＲ法によりサンプルを調整し、自動シーケンサーで塩基配列を決定した。データベース利用による遺伝子間の相同性等の解析には、遺伝子解析用ソフトウエア「DNASIS」（宝酒造）を用いた。

第３節　結果

シロモンヤガＧＶゲノムＤＮＡのＲＥＮパターンの解析並びにプラスミドを用いた切断片のクローニング

ＸｃＧＶαのゲノムＤＮＡのEco Ｒ Ｉ、Bam ＨＩ、Bgl Ⅱ、それぞれの切断片のアガロースゲル電気泳動パターンを Fig. 10 に示した。それぞれの酵素処理によって得られたＤＮＡ切断片は、分子量の大きいものから順にアルファベットで命名をした。なお、ＸｃＧＶαのＲＥＮパターンには、いわゆる"submolar fragment"[116]（分離株が遺伝子的に異なる複数の株の混合である場合、主となる株の切断片に比べて薄いバンドとして検出される混合比の少ない株の切断片）は認められなかった。

ＸｃＧＶαのＲＥＮパターンは、過去に報告された Agrotis segetum[7, 105]、Artogeia rapae[22, 23, 32, 120, 121]、Chilo infuscatelus[33]、C. saccariphagus indicus[33]、Choristoneura spp.[9]、Cydia pomonella[27, 53]、Cyptophlebia leucotheta[65]、Heliothis armiger[119]、Lacanobia oleacea[25]、Phthorimaea operculella[145]、P. brassicae[22, 23, 120, 121]、P. interpunctella[119, 142]、Pseudaletia unipuncta[52]、S. frugiperda[116, 119]、T. ni[116, 119]からそれぞれ分離されたＧＶのパターンとは、全く異なっていた。

上記３種の酵素による切断片の分子量は、Table 8 に示した。各切断片の分子量の合計から、ウイルスゲノムＤＮＡの分子量は約179kbpと算定された。

制限酵素処理によって得られたウイルスＤＮＡ切断片の数は１５から２０本に及び、ほぼ同じ泳動度を持つ複数の断片が生じる場合もあった。また、これらの切断片の中には、マーカーに用いたλファージＤＮＡのHindⅢ最大切断片（約23kbp）よりも分子量が大きいものもいくつか存在していた。そこで、各切断片を明確に識別して、その分子量を算定すると共にウイルスゲノムの制限酵素切断地図を作成することを目的に、プラスミド（pBR325）を用いてEco Ｒ Ｉ切断片のクローニングを行った。各クローンを、アガロースゲル電気泳動とサザンハイブリダイゼーション法によって特定した結果、約500クローンの組換えプラスミドから、全部で20本あるEco Ｒ Ｉ切断片のうち、19本（Table 8 *印）についてクローンを得ることができた。ウイルスゲノム全体を網羅するＤＮＡライブラリーを作成するため、さらに、ファ

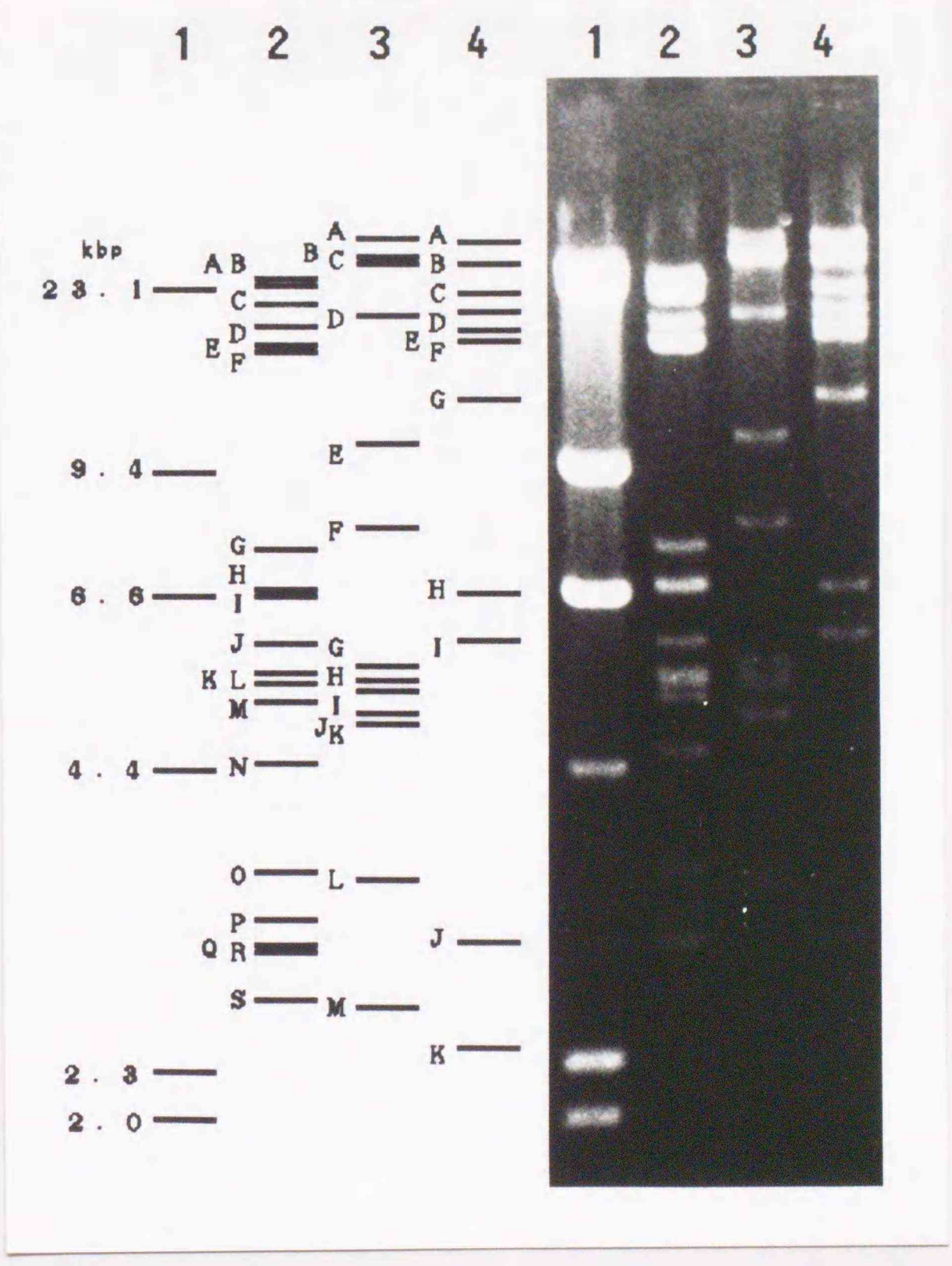


Fig. 10. Diagram of restriction endonuclease profiles and 0.5 % agarose gel electrophoresis of XcGV α DNA digested with *Eco* R I (lane 2); *Bam* H I (lane 3) or *Bgl* II (lane 4), and *Hind* III-cleaved λ phage DNA standards(lane 1).

Table 8. Sizes (in kbp) of restriction fragments of the genome of XcGV

*Eco*R I		*Bam*H I		*Bgl* II	
A	23.4*	A	47.7	A	45.9
B	23.4	B	31.8	B	29.6
C	20.3*	C	31.1*	C	21.0
D	16.9*	D	17.3	D	18.2
E	15.4*	E	10.5*	E	16.8
F	15.2*	F	8.1*	F	15.9
G	7.4*	G	5.7*	G	11.5
H	6.9*	H	5.4*	H	6.7
I	6.8*	I	5.3*	I	6.0
J	5.9*	J	5.0*	J	3.0
K	5.4*	K	4.9*	K	2.4
L	5.3*	L	3.4*	L	1.4
M	5.2*	M	2.6*		
N	4.6*	N	0.1*		
O	3.6*				
P	3.2*				
Q	3.0*				
R	3.0*				
S	2.7*				
T	1.1*				
Total	178.7		178.9		178.4

* : Fragments cloned into plasmids.

ージミド（BluescriptⅡ）を用いてBam ＨＩ切断片のクローニングを行い14本中11本についてクローンを得た（Table 8 *印）。サザンハイブリダイゼーションの結果、すべてのクローンはウイルスＤＮＡ由来であること、最小のEco ＲＩ切断片は約1.1 kbpであること、また、アガロースゲル電気泳動では検出できなかった100bp未満ののBamＨＩ切断片(BamＨＩ-N)が１本存在することが確認された。

ＸｃＧＶαの制限酵素切断地図を作成するために、各プラスミドクローンをラベルして、Eco ＲＩ、Bam ＨＩ、Bgl Ⅱのそれぞれの酵素で切断したウイルスＤＮＡゲノムとのサザンブロットハイブリダイゼーションを行った。この他に必要に応じて、HindⅢ、DraＩ、XbaＩ切断したウイルスゲノムＤＮＡのサザンブロットフィルターを用いたハイブリダイゼーションを行った。ほとんどのクローンは、挿入断片に一致する１本の切断片のみと強くハイブリダイズしたことから、各切断片の塩基配列は特異的なものであると考えられた。しかし、複数の切断片とハイブリダイズするクローンも若干数認められたことから、ウイルスゲノムＤＮＡには、相同性の高い配列を含む領域が存在する可能性も考えられた。

バキュロウイルスの制限酵素切断地図の零点は、granulin遺伝子を基準に定めることが提唱されている[147]。そこでハイブリダイゼーションによるＸｃＧＶαのgranulin遺伝子の特定を試みた。現時点では、granulin遺伝子の塩基配列がデータベースとして利用可能なＧＶはＴｎＧＶとＰｂＧＶの２種ＧＶのみなので、この２種ＧＶの間で塩基配列がなるべく連続して一致している部分をコーディング領域の5'側、中央部、そして3'側の３ヶ所選定し、プローブ用のオリゴヌクレオチド３種類を合成した。オリゴヌクレオチドの塩基配列は、Fig. 11に示した。なお、上記２種ＧＶ間で塩基が異なる部分については、２種の塩基が混在した状態で合成されるように条件を設定した。３種類のオリゴヌクレオチドプローブを用いて、制限酵素で切断したＸｃＧＶゲノムＤＮＡあるいはクローンプラスミドのサザンブロットとハイブリダイゼーションを行った結果、5'側プローブ(5E)ではウイルスＤＮＡブロットには明確なシグナルは認められなかったが、Eco ＲＩ-Cのクローンプラスミドで強いシグナルが認められた。中央部プローブ(M)では、ウイルスＤＮＡブロットのEcoＲ Ｉ-CとBamＨＩ-DとBgl Ⅱ-B、またEco ＲＩ-Cのクローンプラスミドにも強いシ

5E

5'- A $\begin{matrix}G\\A\end{matrix}$ A $\begin{matrix}G\\T\end{matrix}$ CATT $\begin{matrix}A\\G\end{matrix}$ AGATACAGC -3'

M

5'- ATCTCAGAAGAGTTCCC -3'

3E

5'- AC $\begin{matrix}A\\T\end{matrix}$ GG $\begin{matrix}T\\A\end{matrix}$ CC $\begin{matrix}C\\A\end{matrix}$ GC $\begin{matrix}T\\A\end{matrix}$ TATTAA -3'

Fig. 11. The origonucleotide probes used for identification of granuline gene of XcGV

グナルが認められた。3'側プローブ(3E)ではウイルスＤＮＡブロットのEco Ｒ Ｉ断片にはシグナルが認められなかったが、Bam ＨＩ-H、BamＨＩ-IとBgl Ⅱ-Bに強いシグナルが検出された。なお、3Eプローブは Eco Ｒ Ｉ-Cを含め分子量の大きなEco Ｒ Ｉ断片をインサートに持つ複数のプラスミドクローンとも反応した。これらの結果から、granulin遺伝子は、Eco Ｒ Ｉ-CとBgl Ⅱ-Bの共通部分のBam ＨＩ切断部位を含む領域に存在しているものと推定された。

更に、ＴｎＧＶのgranulin遺伝子の大半を含むEco Ｒ Ｉ断片のプラスミドクローンをプローブに用いてウイルスゲノムＤＮＡとのサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、Bam ＨＩ-Dに強く、Bam ＨＩ-Hにやや弱くシグナルが検出され、オリゴヌクレオチドプローブを用いた実験と一致する結果が得られた。そこで、さらにEco Ｒ Ｉ-C断片のプラスミドクローンを数種の制限酵素で切断し、サザンハイブリダイゼーションを行ったところＴｎＧＶＤＮＡクローンプローブはEco Ｒ Ｉ-C断片の末端部と強くハイブリダイズしたので、この領域をBluescriptⅡにサブクローニングし、塩基配列を決定した。その結果、Eco Ｒ Ｉ-C断片には、granulinのＣ－末端の12アミノ酸をコードする36塩基対が欠けているがコーディング領域のほぼ全長が含まれていることが明らかになった。ＮＰＶとＧＶではゲノムＤＮＡ制限酵素切断地図のゼロ点は封入体タンパク質遺伝子を含む最小の制限酵素切断片を基準に定められている[147]が、遺伝子の塩基配列が明かな場合は封入体タンパク質遺伝子のコーディング領域開始点をゼロ点とすることが提唱されている[120]ので、これに従ってＸｃＧＶαの制限酵素切断地図の零点を定めた。零点は、Bam ＨＩ切断部位との関連で示すと断片ＤとＮ間の切断部位から180 bp上流、Eco Ｒ Ｉ切断部位との関連で示すと断片ＣとＬ間の切断部位から703 bp上流である。零点を基に直線化した制限酵素切断地図を Fig. 12(a)に示した。granulinの塩基配列については、後で詳しく述べる。

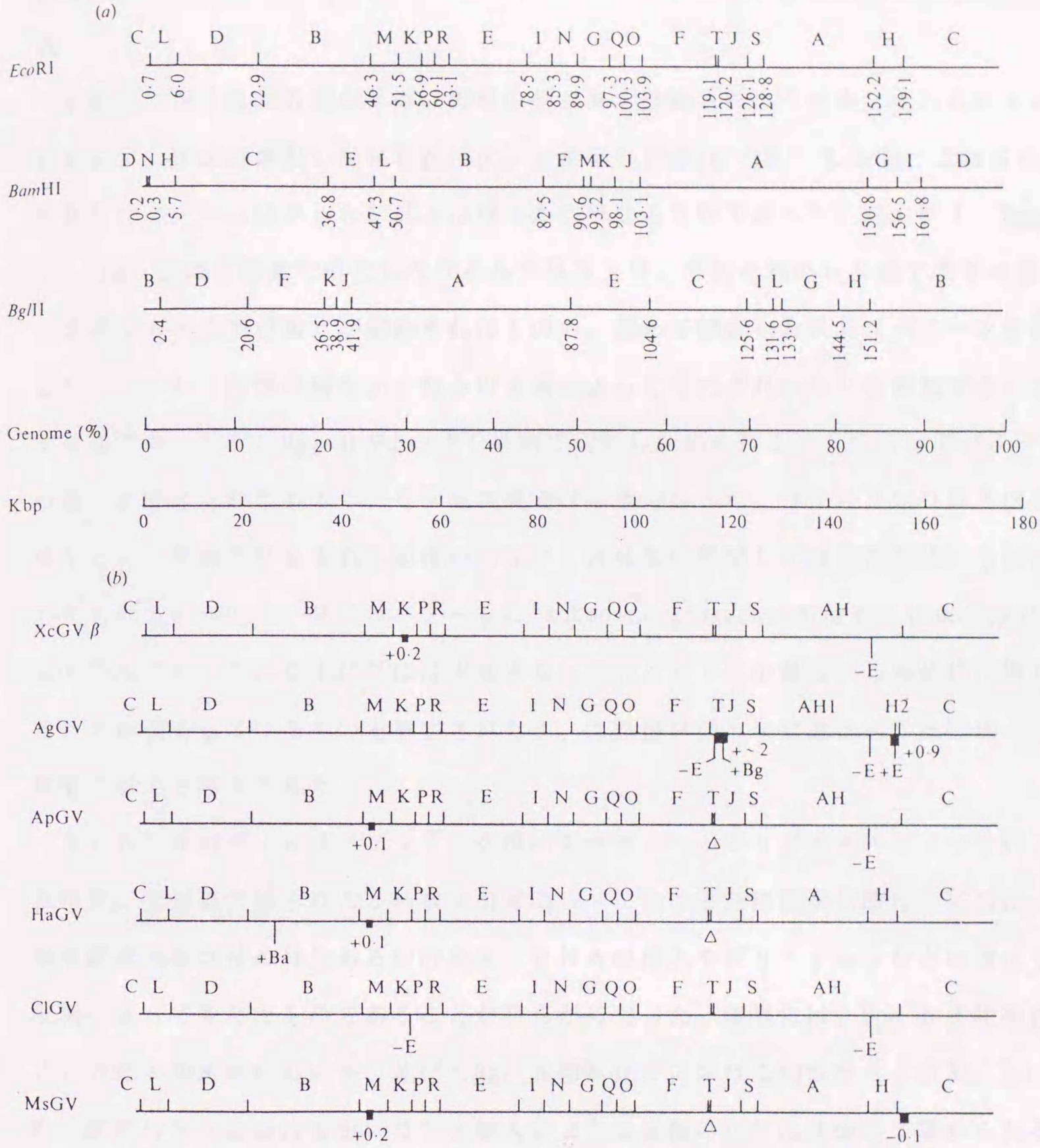


Fig. 12. (a) Physical *Eco* R I, *Bam* H I and *Bgl* II maps of XcGV α DNA. The map was linearized at the start codon of the granulin gene. Letters correspond to fragments in Fig. 10 and Table 8.

(b) Comparative *Eco* R I maps of the XcGV β, AgGV, ApGV, HaGV, ClGV and MsGV genomes showing locations of genotypic differences between XcGV α and each of the other isolates. Additional (+) or lost(-) restriction sites are indicated.

E: *Eco* R I; Ba: *Bam* H I; Bg: *Bgl* II. Boxes identify regions of deletions(-) and insertions(+) of specified size (in kbp) relative to the genome of XcGV α. The symbol △ indicates that the size of the fragment is slightly larger than that of the corresponding fragment of XcGV α.

異なる宿主から分離された各ＧＶのＲＥＮパターンの比較と制限酵素切断地図の作成

本研究で得られた数種ＧＶは、異種の宿主から分離されたウイルスであるにもかかわらず、非常に類似したＲＥＮパターンを示した(Fig. 13)。しかし、これらＧＶのＲＥＮパターンはＰｕＧＶＨとは明らかに異なるものであった。Eco Ｒ Ｉ、Bam ＨＩ、Bgl ＩＩの各酵素で消化したウイルスＤＮＡは、それぞれのＧＶ間で若干の差異（切断片の欠失や付加）が認められたものの、極めて類似したＲＥＮパターンを示した。Eco Ｒ Ｉ切断の場合、これらの差異によってそれぞれのＧＶを識別することが可能であったが、Bgl ＩＩやBam ＨＩ単独で切断した場合は２、３のＧＶでパターンの違いが認められたものの、ＧＶ間の識別は困難であった。ウイルスのＤＮＡは各ＧＶとも、野外で採集された幼虫の死体を１個体毎に精製して得た顆粒体から抽出したものであったが、ＲＥＮパターンに"submolar fragment"が認められたのはＣｌＧＶのみであった。ＣｌＧＶには主体となっているＧＶに少量ながら遺伝的に異なるＧＶが混合しているものと推察されたが、これ以外のＧＶは遺伝的にほぼ均一な状態であると考えられた。

ＸｃＧＶαのゲノムライブラリーを用いてサザンハイブリダイゼーションを行った結果、北海道で得られた６種宿主由来のＧＶにおける制限酵素切断片の差異は、制限酵素切断部位の付加あるいは消失、ＤＮＡの挿入やデリーションなどの遺伝子変異によって生じたものであることが明らかになった。変異には、Eco Ｒ Ｉ切断片ＡとＨ間の切断部位の消失、並びにBgl ＩＩ切断片Ｃにおける切断部位の付加、Eco Ｒ Ｉ断片ＭやＴにおける短いＤＮＡ挿入のように複数のＧＶに共通して認められるものと、Eco Ｒ Ｉ断片ＨやBgl ＩＩ断片Ｃ内部における切断部位の付加や、ＡｇＧＶのみで認められたEco Ｒ Ｉ断片ＪとＴ間の切断部位の消失、ＣｌＧＶで認められたEco Ｒ Ｉ断片ＫとＰ間の切断部位の消失など特定のＧＶのみに認められるものとがあった。

変異の認められた切断片の命名は、Smith & Crook(1988)[120]が提案したシステムに従って行った。このシステムでは、２つの切断片間の制限酵素切断部位の消失によって生じた新しい切断片は基準とするＧＶ（本研究ではＸｃＧＶα）の対応す

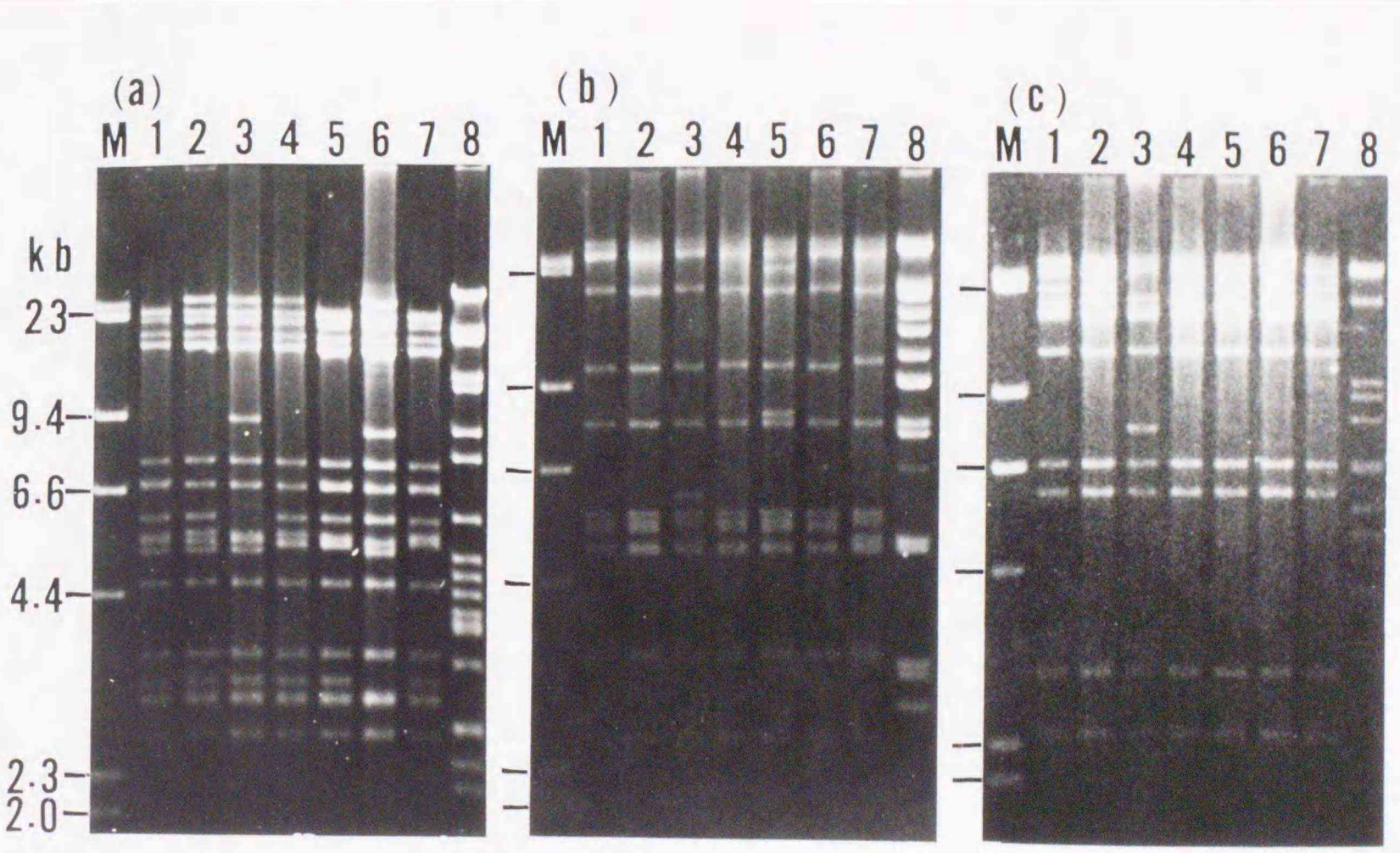


Fig. 13. Electrophoresis in 0.5 % agarose gels of XcGV α (lanes 1), XcGV β (lanes 2), AgGV (lane 3), ApGV (lanes 4), HaGV (lanes 5), ClGV (lanes 6), MsGV (lanes 7) and PuGV (lanes 8) DNA digested with *Eco* R I (a), *Bam* H I (b) or *Bgl* II (c) with *Hind* III-cleaved λ phage DNA standards (lanes M).

る２つの切断片の名前を併記して表示され、ＸｃＧＶαのEco Ｒ Ｉ断片ＡとＨの間の切断部位が消失して生じたと考えられるＸｃＧＶβの切断片はEco Ｒ Ｉ－ＡＨとなる。また、ある切断片の内部に切断部位が付加するかたちで２つの断片が生じている場合、その断片は基準ＧＶの対応する断片の名前の後に数字を付けて表され、基準ＧＶのBam ＨＩ-C切断片に新たに切断部位が付加してできたと考えられるＨａＧＶの切断片は分子量の大きいものからBam ＨＩ-C1、-C2となる。このシステムに従い、各ＧＶの制限酵素切断地図を作成し、ＸｃＧＶαとの相違点を Fig. 12(b) に示した。また、これをもとに変異の起きた断片の分子量を推定し Table 9に示した。

シロモンヤガから個体別に分離されたＧＶのＲＥＮパターンの比較と制限酵素切断地図の作成

野外から採集して個体飼育中に発病したシロモンヤガ幼虫からＧＶを個体別に分離して得られた、ＸｃＧＶα、βを含む１４個体からの分離ＧＶを供試して、Eco Ｒ Ｉ、Bam ＨＩ、Bgl ＩＩの３種制限酵素によるゲノムＤＮＡ切断パターンの比較を行った(Fig. 13,14)。これらはすべて、1984年から1988年に芽室町内の北海道農業試験場畑作部圃場を中心とした狭い区域で採集された幼虫から得られたＧＶである。供試ＧＶのＲＥＮパターンは非常に類似していたが、小さな差異をもとに以下の９タイプに分類することができた。1) XcGV 3,6,10； 2) XcGV 5,7,8； 3) XcGV β, 12；4) XcGV α； 5) XcGV 1； 6) XcGV 2； 7) XcGV 4； 8) XcGV 9; 9) XcGV 11。

異なる数種のヤガ科幼虫から分離されたＧＶと同様、シロモンヤガの各個体から分離されたＧＶに特有の切断片は、制限酵素切断部位の付加あるいは欠失、並びにＤＮＡの挿入や欠失によって生じたものと考えられるが、シロモンヤガの個体別分離ＧＶには前述のヤガ科各種からの分離ＧＶと全く同一のものは認められなかった。しかし、個体別分離ＧＶの制限酵素切断部位の変化の中には、異種ヤガ科幼虫からの分離ＧＶと共通するものも認められた。ＸｃＧＶαにおけるEco Ｒ Ｉ切断片ＡとＨ間の切断部位は、他の個体別分離ＧＶでも失われており一つの大きな断片ＡＨを生じていた。また、Eco Ｒ Ｉ－ＭやBam ＨＩ－Ｅに生じた小さなＤＮＡ挿入は複数の個体別分離ＧＶに共通する変異であった。Bam ＨＩ－Ｃ断片内のBam ＨＩ切断部位の

Table 9. Sizes (in kbp) of variant restriction fragments of the genome of GV isolates

Isolate	*Eco*R I		*Bam*H I		*Bgl* II	
XcGV β	AH*	30.3				
	K	5.6				
AgGV	AH1	30.0	I	6.2	C1	15.9
	TJ	9.2			C2	8.1
	H2	1.2				
ApGV	AH	30.3	E	10.6		
	M	5.3				
	T	1.1**				
HaGV	M	5.3	C1	22.7		
	T	1.1**	E	10.6		
			C2	8.4		
ClGV	AH	30.3				
	KP	8.5				
MsGV	M	5.4	E	10.7		
	T	1.1**	I	5.2		

* Letters give the designations of the variant fragments (see Results).

** These fragments are slightly larger than the corresponding fragment of XcGV α

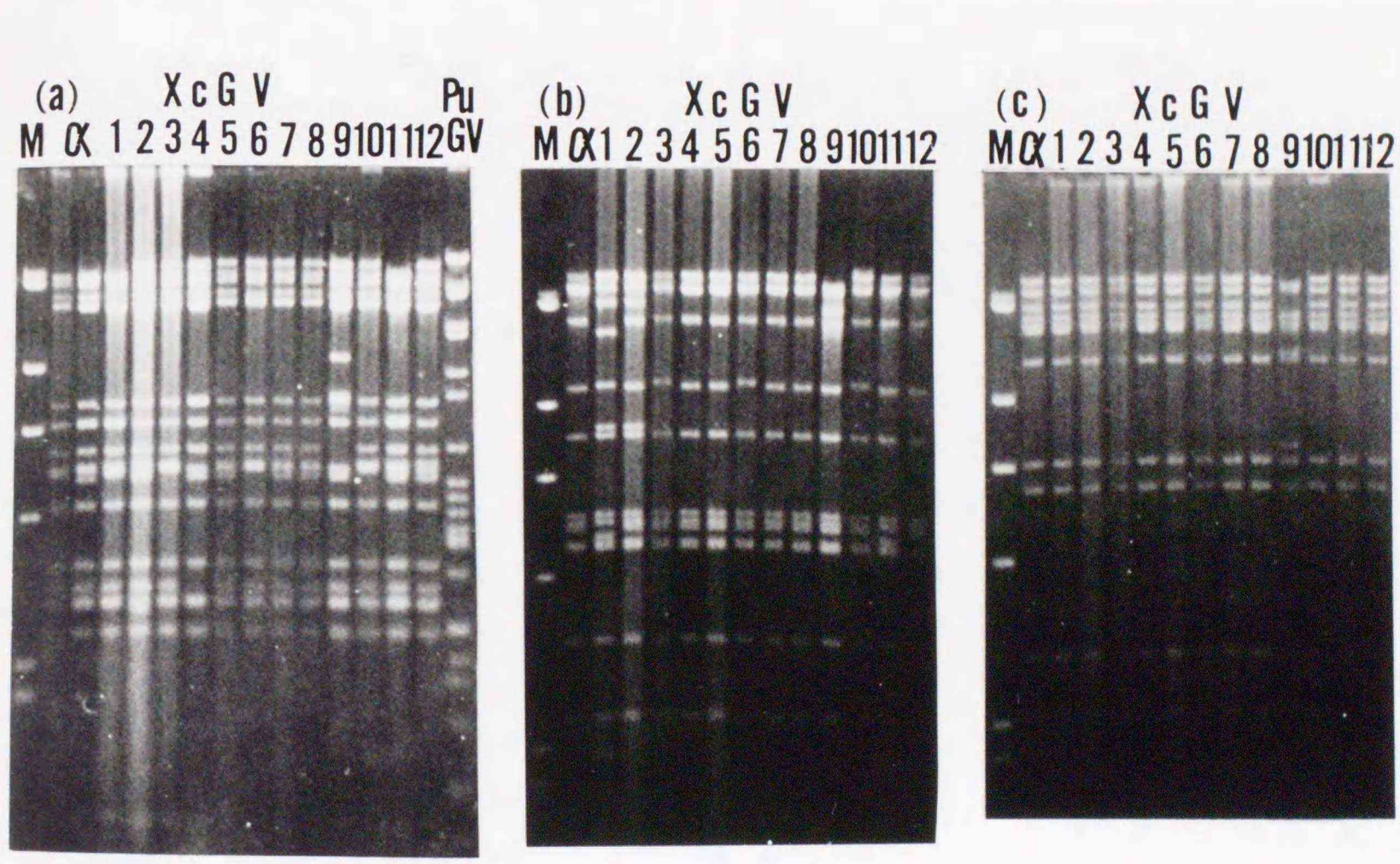


Fig. 14. Electrophoresis in 0.5 % agarose gels of XcGVα, XcGV 1 to 12 and PuGV DNA digested with *Eco* R I (a), *Bam* H I (b) or *Bgl* II (c) with *Hind* III-cleaved λ phage DNA standards (lanes M).

付加は、ＸｃＧＶ 1と2、そしてＨａＧＶで認められた。異種ヤガ科由来のＧＶの解析結果と、ハイブリダイゼーションの結果から、これらのシロモンヤガ個体別分離ＧＶに生じた変異を推定し、分子量の概算値と共に Table 10に示した。

上記のＧＶは野外から採集された個体から得られた野生型であるにも関わらず、ＲＥＮパターンには、ＸｃＧＶ９以外では"submolar fragment"は全く認められなかった(Fig. 14)。ＸｃＧＶ９は明らかに遺伝的に異なる複数のＧＶが混合したものであるとみなすことができるが、それ以外の個体別分離ＧＶはそれぞれが遺伝的に類似度の高いＧＶから構成されているものと考えられた。

ＸｃＧＶのgranulin遺伝子の塩基配列決定並びに他種ＧＶの同遺伝子との比較

サザンハイブリダイゼーションによって、ＸｃＧＶαのEco ＲＩ切断片Eco ＲＩ-Cにgranulin遺伝子のＮ末端側の大部分が存在していることが確認され、更にこの切断片と連続しているEco ＲＩ-Lに同遺伝子のＣ末端側が存在していることが確認されたので、これらEco ＲＩ断片のプラスミドクローンからサブクローニングを行い、自動シーケンサーを用いてgranulin遺伝子の塩基配列を決定した。ＸｃＧＶαゲノムのgranulin遺伝子を含む領域について作成した制限酵素切断地図はFig. 15に示した。これまでにＴｎＧＶとＰｂＧＶの同遺伝子について、塩基配列とアミノ酸配列が報告されている[3, 19]ので、それらとＸｃＧＶαで得られた結果との比較を行った。三種ＧＶのgranulin遺伝子の塩基配列は、Fig. 16に、それから推定されるアミノ酸配列は、Fig. 17に示した。コーディング領域における塩基配列の相同性はＸｃＧＶαとＴｎＧＶ間で90%と非常に高く、ＸｃＧＶαとＰｎＧＶ間では73%とやや低かった。また、アミノ酸配列では、ＸｃＧＶαとＴｎＧＶ間で異なるのは第26番目の１個だけで、この２種ＧＶ間の相同性は非常に高いことが明らかになった。ＸｃＧＶとＰｂＧＶのアミノ酸配列相同性は77%であった。また、開始コドン上流域の塩基配列を比較したところ、バキュロウイルスの後期プロモーター配列であるＡＴＡＧＧ[15]を含む12塩基部分は３種ＧＶで完全に一致していた(Fig.18)。一方、終始コドン下流域におけるＸｃＧＶαとＴｎＧＶの塩基配列の相同性は上流域やコーディング領域に比べてやや低く、終始コドン下流の113 bpの領域における相同性

Table 10. Sizes (in kbp) of variant restriction fragments of the genome of XcGV isolates

Isolate	*Eco*R I		*Bam*H I		*Bgl* II	
XcGV 1	M	5.3	C1	22.7		
			D1	16.0		
			E	10.6		
			C2	8.4		
			I	5.2		
			D2	2.3		
XcGV 2	AH	30.3	C1	22.7		
	K	5.6	C2	8.4		
	a1*	2.9				
XcGV 3,6, 10	AH	30.3	E	10.7		
	M	5.4				
XcGV 4	AH	30.3				
	KP?	7.4				
XcGV 5,7, 8	AH	30.3				
XcGV 9	AH	30.3	A	lost	A	lost
	J	lost	a1*	ca.30	C	lost
	M	lost	a2*	ca.20	a1*	ca.35
	a1*	10.2	s1	ca.15	a2*	ca.12
	a2*	7.9	s2	5.9	s1	ca.16
	s1	7.3			s2	7.2
XcGV 11			I	5.2		
XcGV 12	AH	30.3				
	K	5.6				

* a1 and a2 indicate additional fragments, corresponding fragments of XcGV α are not defined.

s1 and s2 indicate submolar fragments.

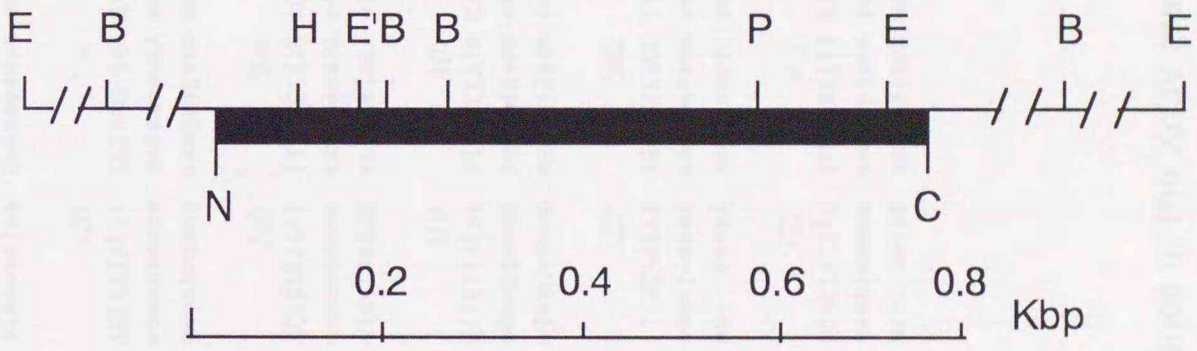


Fig. 15. Restriction endonuclease map of the region of the XcGV α genome containing the granulin gene. N and C indicate the NH_2- and -COOH termini respectively.

Restriction enzyme abbreviation are E,*Eco*R I ; E', *Eco*R V ; B, *Bam*H I ; H, *Hind* III ; P, *Pst* I .

```
                10         20         30         40         50         60         70         80         90        100        110        120
XcGV    ATGGGATACA ACAAATCATT GAGATACAGC CGTCACAATG GCACCACATG TGTAATTGAC AACAAGCACC TTAAAAGCTT AGGCTCTGTA CTGGGTGATG TGAGGCACAA GGAGGAGTTG
TnGV    ********** ********** ********** ********** ********** ********** *****A**T* ******CT** ******A*** ********** ********** ******A***
PbGV    ********T* *T*G*G**** A********** AAA***G*A* *T*****T** C********** ***C*A***T AC**G**T** G**TG****G T**AAA***** *C*AA**T** AA****TCGT

                130        140        150        160        170        180        190        200        210        220        230        240
XcGV    ATTCGCGAAG CACAGTTTGA CCCAATCAAA GATATCGCCA ACCAGTACAT GGTGACTGAG GATCCGTTCC GCGGTCCTGG TAAAAATGTA AAAATCACCC TGTTCAAAGA GATTCGCCGG
TnGV    ********** ****A**C** *********G **C******* ********** *********A *****C***A *A**C***** ***G*****T **G**T**** ****T**G** ******T***
PbGV    C*G******* *CG*AA**** A**CG*TTT* **C**T***G ****A***** ***C**C*** ********** *T*****C** A**G*****T *GG**T**** *T******** ATG*A*A***A

                250        260        270        280        290        300        310        320        330        340        350        360
XcGV    ATCCAGCCCG ACACCATGAA GCTCGTGTGC AACTGGAGCG GCAAAGAGTT TTTGCGCGAG ACCTGGACTC GTTTCATCTC CGAAGAGTTC CCGATCACCA CCGATCAAGA AATTATGGAC
TnGV    ********A* *T******** ***T*****T ********** ********** *********A ********** ********** A********** **C******* *******G** *********T
PbGV    G**G*A**** ****AT**** ***G****** ********** *T*****A** *C*T**T**A *TG******* ****T***** A********** **A******* ****C***C* ***A***A**

                370        380        390        400        410        420        430        440        450        460        470        480
XcGV    CTGTGGTTTG AACTGCAACT GAGACCCATG CAGCCCAACA GATGTTACAA GTTTACCATG CAATACGCTC TGGCTGCCAA CCCCGATTAC GTTGCCCACG ACGTGATCCG TCAGCACGAT
TnGV    ********** *G******** TC*G****** ********** *G**C***** ***C**G*** ********C* *******G** ******C*** **C**T**** *T*****T** C**A******
PbGV    A*******C* *GA*T***G* A*****A*** **A**T***C *T**C***** ******T*** *********T *A*A***TC* ******C*** ***C****T* ****T**T** CGCC**G***

                490        500        510        520        530        540        550        560        570        580        590        600
XcGV    CCCTATTACG TTGGTCCCGA CAACCGTGAA CGCATCAACC TTTCCAAGAG AGGTCTCGCC TTCCCTCTGA CGTGCCTGCA GTCGATCTAC AACGAAAACT TTGAGGAGTT CTTCGATCAG
TnGV    *****C**** *C**A***** ********** ********** ****T***** ******T*** ********** *T**T**T** ***T****** ********** ****A***** **********
PbGV    **T**C***A ********A* ***TAT**** ********T* *G---****A ****T****T *****G**T* T******T** A**CG*G*** **T**C**** ****AACT** ***T**AG*T

                610        620        630        640        650        660        670        680        690        700        710        720
XcGV    GTCCTGTGGC CATACTTCCA CCGTCCCCTG GTGTACGTGG GCACAACGTC TGCCGAGATT GAAGAGGTCA TGATCGAAGT GGCTCTTCTC TTCAAGATTA AGGAATTCGC TCCCGACGTA
TnGV    **T******* ********** ******T**C **C******* ****G***** ******A*** ********** ********** ******G*** ********C* *A******** ***T**T**G
PbGV    **A**A**** ********** *A*A**A**C **C***A*C* *T**C**C** *AG***A*CC *****AA**T *AC******* AT**T*CT*G ********C* ********** A*****T***

                730        740        750
XcGV    CCATTGTTTA CTGGACCCGC TTACTAA...
TnGV    **TC****** *******A** A**T***...
PbGV    *******AC* *A**T***** ***T***...
```

Fig. 16. Comparison of the nucleotide sequence of the XcGV granulin gene coding region to that of TnGV (Akiyoshi et al., 1985) and PbGV (Chakerian et al., 1985). Asterisks indicate homology with the XcGV gene; dashied lines were inserted in order to align the sequence.

```
                10        20        30        40        50        60        70
XcGV  MGYNKSLRYS  RHNGTTCVID  NKHLKSLGSV  LGDVRHKEEL  IREAQFDPIK  DIANQYMVTE  DPFRGPGKNV
TnGV  **********  **********  *****T****  **********  **********  **********  **********
PbGV  ****RA****  K*E*******  *Q*Y****A*  *K**K**KDR  L***EIE*VL  ***D******  **********
                80        90       100       110       120       130       140
XcGV  KITLFKEIRR  IQPDTMKLVC  NWSGKEFLRE  TWTRFISEEF  PITTDQEIMD  LWFELQLRPM  QPNRCYKFTM
TnGV  **********  **********  **********  **********  **********  **********  **********
PbGV  R******C**  VE***L****  **********  M*********  ******Q**N  M***I*V***  **********
               150       160       170       180       190       200       210
XcGV  QYALAANPDY  VAHDVIRQHD  PYYVGPDNRE  RINLSKRGLA  FPLTCLQSIY  NENFEEFFDQ  VLWPYFHRPL
TnGV  **********  **********  **********  **********  **********  **********  **********
PbGV  ****D*H***  *P*****AQ*  ***I**N*I*  ****-*K*F*  ***M****V*  *D***T**ED  **********
               220       230       240       248
XcGV  VYVGTTSAEI  EEVMIEVALL  FKIKEFAPDV  PLFTGPAY
TnGV  **********  **********  **********  ********
PbGV  **I****S*T  **ILL**SF*  **********  **Y*****
```

Fig. 17. Comparison of the derived XcGV granulin amino acid sequence to that of TnGV granulin (Akiyoshi *et al*., 1985) and PbGV granulin (Chakerian *et al*., 1985).
Asterisks indicate homology with the XcGV granulin; dashed lines were inserted in order to align the sequences.

```
XcGV    CCG  GACAAACTAT  TGCTGGCGCG  CCGTTTATTG  ACGGCGATTC  TCAGCTCGGA  TTTCAGCACC
TnGV    ***  **T*******  ****A*****  T*****G**T  T*********  *G********  *C*A***GG*
PbGV    CAAA T****TTACG  ACAAA*T*TA  TT*AAACAAT  GAAA*A*AAA  AGGA**TT*T  ACAAG*A*AT
             -140        -130        -120        -110        -100        -90

XcGV         GCCATCGACC  GTTTGTTGCA  TTTTTTATTG  GACAACAAAG  CGGAAAATGA  TTTATAAGGA
TnGV         **********  **********  ***A******  *******G**  **A*******  **********
PbGV         ATT**GCTGT  ACGGAG*AG*  CACGCG*AGA  A*T**AT**T  *ACGCCGGA*  **********
             -80         -70         -60         -50         -40         -30

XcGV         ATTT-----A  TATCAAAACA  ATG
TnGV         ****-----*  **********  ATG
PbGV         ****TAATTT  **A*****-T  ATG
             -20         -10
```

Fig. 18. Comparison of 5' flanking regions of XcGV, TnGV and PbGV granulin genes. Asterisks indicate homology with the XcGV sequence ; dashed lines were inserted in order to aline the sequences. The conserved 5' flanking sequence commonly found in baculoviruses late hypertranscribed genes is underlined.

```
          End 750        760        770        780        790        800
XcGV      TAA AAA  AATAAACACT ATTTATGTAA AAAAGTTGTA TTTATTGATC TCATTTAATT
TnGV      TAA ATA  AATAATAAAC GTTTGTATTG TGAAATAATT TGTATTTATT GACCATTAAT
PbGV      TAA ACG  TCAAAATCAT CGGTATTTTT AGATTCGGTG TTGCACCAGG TTTCGATTCG

              810        820        830        840        850        860
XcGV   ACTCCAATCA CTGTTATATT CACTGTGATC ACTAAGTTCG GTGACTTGTC TTCGTTGATC
TnGV   TACTCCAATC ACTATTAGGT TCACTGTGAT CACTCAATTC CGTGACTTGT CTCCGTTGAC
PbGV   GTGTTTATGT AATTAAAACA ACGTGAGTAA ACGGCTGGTC GGGTGCATTT TGTTTCGAA
```

Fig. 19. Comparison of 3' flanking regions of XcGV, TnGV and PbGV granulin genes. Possible polyadenylation signals are underlined.

は31%で、46bp目で1か所スペースを入れた場合でも73%であった。また、ポリアデニレーションシグナル配列[13]を調べたところ、ＸｃＧＶは同シグナル配列を保有していたが、その位置はＴｎＧＶ、ＰｕＧＶとは異なっていた(Fig. 19)。

第4節　　考察

異種宿主分離ＧＶゲノムＤＮＡのＲＥＮパターン解析による比較と制限酵素切断地図の作成

ＲＥＮパターンによる解析は、近年バキュロウイルスの各系統の同定や変異の検出に広く使われるようになってきた。しかし、バキュロウイルスのＲＥＮパターンに関する研究の多くはＮＰＶに関するものであり、ＲＥＮパターンが報告されたＧＶはまだ少なく、使用された制限酵素もEcoＲＩ1種類という場合がほとんどである。本研究で扱っているＸｃＧＶ以外で、これまで制限酵素切断地図が作成されたＧＶは、ＡｒＧＶ[120]（ＰｒＧＶ[32]はＡｒＧＶの変異株と見なす）、ＣｐＧＶ[27]とCryptophlebia leucotretaＧＶ[65]、Agrotis segetumＧＶ[105]の4種に過ぎない。なお、前2種ＧＶについては分離場所の異なるＧＶ、すなわち地理的変異株として扱われているＧＶ間の遺伝的変異が制限酵素切断地図上で特定されている。

本研究では、北海道に分布するヤガ科害虫のうち、属の異なるシロモンヤガ、ガンマキンウワバ、フキヨトウ、ショウブオオヨトウ、タンポキヨトウ、アワヨトウからＧＶを分離して報告したが、このうちガンマキンウワバ、フキヨトウ、ショウブオオヨトウ、タンポキヨトウについては、ＧＶが分離、報告されたのは本研究が初めてである。ＧＶが分離された各宿主昆虫は分類学的に特に近縁ではなかったため、当初筆者らはこれらの分離ＧＶを異なるＧＶと推測したが、各分離ＧＶは形態的に類似しており予備実験の結果から交差感染の可能性が示唆され、各ＧＶの異同を明らかにすることが必要となった。Chang & Tanada(1978)[20]は、ＰｕＧＶＨがS. exigua、T. ni 並びにA. californicaに交差感染することを血清学的手法で示した。また、Tanada & Omi(1974)[138]は、カリフォルニアのアルファルファ圃場で

数種の宿主幼虫から分離したＧＶが供試した５種幼虫のうち４種に交差感染したことを報告した。しかし、この報告では各ＧＶの分類同定は明らかにされていない。この後、Federich(1978)[36]は、Scotogramma trifoliiＧＶがA. californicaとT. ni に交差感染することを報告し、ＧＶの分類同定法確立の必要性を説いた。以上の事柄を踏まえ、筆者は、ウイルスＤＮＡのＲＥＮパターンを解析することによって、北海道で分離されたＧＶに関する遺伝的相同性の検討を行うことにした。

ＲＥＮパターンの比較によって、今回得られたそれぞれのＧＶは、異なる宿主昆虫から分離されたにも関わらず、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明らかになった。これらＧＶのゲノムサイズは約179kbpでＡｒＧＶ[120]やＣｐＧＶ[27]（約110～120kbp）よりも大きいが、ＴｎＧＶの174.8／176.5kbp[116, 119]とはほぼ同じであった。制限酵素切断地図の比較の結果、供試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あるいは、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。このような遺伝的な変異は、A. rapaeとその近縁種から分離されたＧＶやＣｐＧＶの地理的変異ＧＶでも観察されている[120, 27]。本研究では、異種宿主からの分離ＧＶの比較に加え、シロモンヤガから得られた個体別分離ＧＶ14例についても、ＲＥＮパターンの比較を行ったが、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った。このことから、これらのＧＶゲノムの変異は、宿主の違いとは関係なく生じているものと考えられた。また、今回得られた各ＧＶ間の遺伝子変異の程度は、世界の各地域から分離されたＡｒＧＶ間に認められる変異[120]よりも小さかった。これらの結果から、今回得られたすべての分離ＧＶを単一のウイルスの遺伝子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-migrum GV (XcGV)として取り扱うことにした。ＸｃＧＶは少なくとも異なる６つの属の宿主に感染性を持ち、ＧＶとしては広い宿主域を持っている。なお、シロモンヤガのＧＶについては過去にVybornov et al. (1982)[148]の報告があるが、これにはウイルスの形態、感染特性に関する詳しい記載がなく、今回北海道で分離したＧＶと同種であるか否かについては、今後の研究を待たなくてはならない。その意味では、本論文で扱ったＸｃＧＶは、ＸｃＧＶ日

本株（ＸｃＧＶ－Ｊ）とすべきであろう。

バキュロウイルスの野生株の多くは、遺伝的に不均一で、ＲＥＮパターンにはしばしば"submolar fragment"が認められる[116]。今回得られた分離ＧＶのなかで、このような不均一性が認められたのはＣｌＧＶとＸｃＧＶ９のみであり、それ以外のＧＶは遺伝的な均一性がかなり高いものと考えられた。ＸｃＧＶは、若齢期にウイルス接種をした場合でも感染個体が老齢期まで生存する例が多く、野外においても、若齢期に低いウイルス濃度で感染が成立した場合は体内のウイルスが比較的均一な状態に保たれ「in vivo 純化」[121]に準ずる状態が起こるものと考えられる。今回ＧＶが分離された宿主のうちで、シロモンヤガとガンマキンウワバは発生量も多く、また野外におけるＧＶの発病率も３～５齢期では10～30％と高い。このことから、シロモンヤガとガンマキンウワバは、北海道におけるＸｃＧＶの主な宿主であると考えられる。

バキュロウイルスの分類同定については、以前から分離宿主を基準とする古典的な方法を改めるべきであるとの見解が繰り返し述べられてきた[24, 40, 86, 117]。ＮＰＶでは、ＲＥＮ法による分類同定が広く使われるようになってきたが、ＧＶは、ＮＰＶよりも宿主域が狭く自然状態では交差感染が起こる可能性が低いと見られていたこともあり、古典的な分類法に対する批判はＮＰＶほど強くなかったように思われる。北海道における分離ＧＶに関する本研究の解析結果は、野外でもＧＶの交差感染が恒常的に起こり得ることを遺伝子的に明らかにしたものであり、ＧＶの分類に基本的な改善を行う必要性を強く示している。今後、分離ＧＶ間の近縁性を考える上でも、これまでに報告されたＧＶを含め、分子生物学的検討を詳細に行う必要があると思われる。

granulinの遺伝子解析

バキュロウイルスの中でＮＰＶとＧＶは封入体を形成するという共通の特性を持っている。ＮＰＶの遺伝子解析は、現在では全塩基配列決定の段階にまで到達しているが、最初に塩基配列が明らかにされた遺伝子は封入体タンパク質"polyhedrin"であった[56]。ＧＶの場合も最初に塩基配列が報告されたのは"granulin"であった

が、ＮＰＶでは現在までに10種を越えるウイルスでpolyhedrinの塩基配列が報告されているのに対し、granulinの全塩基配列の報告は1985年にＴｎＧＶ[3]とＰｂＧＶ[19]で相次いで発表されて以来途切れていた。Crook(1991)[24]は、ＴｎＧＶ、ＰｂＧＶに加え、未発表のＣｐＧＶのデータを基に３種ＧＶ間のgranulin遺伝子の比較を行っている。２種ＧＶ間の塩基配列とアミノ酸配列の相同性は、ＴｎＧＶとＰｂＧＶでは73％と77％、ＴｎＧＶとＣｐＧＶ間では78％と85％、ＰｂＧＶとＣｐＧＶ間では77％と83％であったと報告している。この結果から、ＴｎＧＶとＰｂＧＶの遺伝的距離はＣｐＧＶと他の２種ＧＶそれぞれとの距離よりも遠いことが示唆された。また、本研究で解析されたＸｃＧＶのgranulin遺伝子はＴｎＧＶの遺伝子と非常に相同性が高く、アミノ酸配列はほぼ同一であった。この相同性の高さは、ＧＶにおけるgranulinのタンパク質としての機能の重要性を示唆している。ＴｎＧＶとＸｃＧＶはＲＥＮパターン、宿主域、感染力等様々な特性が異なることから別種のウイルスであることは明らかであるが、両者ともヤガ科から分離されたこと、共通の宿主が存在すること、ゲノムサイズがほぼ同じであること等から類似性は高いものと推測され、本研究ののgranulin遺伝子のデータはこれを裏付けるものと言える。

鱗翅目から分離されたＮＰＶ間ではpolyhedrinのアミノ酸配列の相同性は85～90％であるが[106]、ＧＶ間の相同性は４種のデータで77～99％とＮＰＶの範囲を越える結果となった。現在ＧＶは１属として扱われているが、今後多数のＧＶで遺伝子の比較が可能になれば、遺伝的な類似性によってＧＶがさらにいくつかのグループに分けられる可能性もある。

granulin遺伝子については、ＴｎＧＶ、ＰｂＧＶとＣｐＧＶの比較から、バキュロウイルスの後期プロモーターに共通の配列[15]に２塩基対を加えたＴＴＴＡＴＡＡＧＧＡＡＴＴＴの14塩基対が開始コドンの約20bp上流に存在することが報告されている[24]。開始コドン上流の －32～０までの間はＸｃＧＶとＴｎＧＶで塩基配列は完全に一致しており、もちろんＸｃＧＶにもこの共通配列が存在していた。これらの結果は、ＧＶにとってgranulin遺伝子の発現コントロールが非常に重要であることを示唆している。

第３章　ＸｃＧＶの形態並びに感染特性

第１節　目的

北海道の畑作物害虫のうち、複数の種からＧＶが分離されたことを第１章で、また、各分離株のウイルスゲノムＤＮＡのＲＥＮパターンの比較等から、６種の異なる宿主から分離されたＧＶが、同一ウイルスあるいはゲノムの一部を異にする変異ウイルスとして位置づけられることを第２章で述べた。第３章以降ではこれらＧＶの代表としてＸｃＧＶを取り上げ、その形態的特性並びに感染特性について詳細な検討を行ったので報告する。

ＸｃＧＶはＧＶとしては広い宿主域を持っている。野外でも複数種のヤガ科害虫で感染増殖が可能であり、特に、シロモンヤガとガンマキンウワバでは幼虫期の死亡原因として個体数変動の重要な役割を担っているものと考えられる。昆虫病原性ウイルスによる害虫防除を行う際、ウイルスの持つ高い宿主特異性は、安全性が高く生態系の攪乱が少ないという利点につながる一方で、防除対象害虫の幅が狭いという欠点ともなっている。実際の防除では、複数害虫の同時防除を求められる場合が多く、このためには宿主域がなるべく広く、感染力がより高いウイルスが必要となる。本研究で新しく分離されたＸｃＧＶは、この点に関し有望な特性を持っているものと考えられる。そこで第３章では、ＸｃＧＶの宿主域、感染力、感染幼虫の発育と致死日数など病理学的性質を調べ、また、圃場での防除効果試験も併せて行い、ＧＶの害虫防除素材としての可能性を検討した。

第２節　実験材料および方法

電子顕微鏡によるＸｃＧＶの形態観察

材料には in vivo純化後シロモンヤガ幼虫で増殖したＸｃＧＶαを供試し、顆粒体の精製とＳＥＭ用の試料作成は、第１章の方法に従って行った。なお、ＥＭ用試

料の調整は、以下の通り行ない、観察には透過型電子顕微鏡（日立 H-7000)を用いた。ＥＭ試料の調整：顆粒体の蒸留水懸濁液に1M NaOHを加えて、最終濃度が1mg顆粒体／ml、0.02M NaOHとなるように調整し、30分間氷中で溶解。5,000gで５分遠心分離後、上清に10mM Tris-HCl（pH 8.0）を２倍容量加え、さらに30,000gで15分遠心分離してウイルス粒子の沈澱を得る。沈澱を蒸留水に再懸濁し、Dip法を用いて２％酢酸ウラニルでネガティブ染色を行った。

宿主域の調査

実験には、各ＧＶの原宿主を含む下記のヤガ科害虫14種を供試した。アワヨトウ、オオフタオビキヨトウ(Mythimna grandis)、カブラヤガ、ガンマキンウワバ、シロシタヨトウ、シロモンヤガ、ショウブオオヨトウ、タンポキヨトウ、ハスモンヨトウ、ミヤマヨトウ(Lacanobia thalassina)、マエジロヤガ(Ochropleura plecta glaucimacula)、モクメヨトウ(Axylia putris)、ヨトウガ、タバコガ(Helicoverpa assulta)。実験室内で累代飼育した成虫、あるいは、ブラックライトで採集したメス成虫から採卵・孵化させた幼虫を第１章と同様に人工飼料あるいは食草で飼育し実験を行った。

供試ウイルスは、第２章に示した野外幼虫から個体別に分離・精製した顆粒体、あるいはそれを室内飼育した原宿主幼虫に接種して増殖したものを用いた。

ウイルスの接種は、顆粒体の濃厚懸濁液（顆粒体５～20mg／ml）を人工飼料に混合または滴下するか、食草に塗抹して、各供試幼虫に摂食させる方法で行った。供試幼虫は、ウイルス接種後、個体別飼育して発病経過を観察し、幼虫死亡後に体液や脂肪体の塗抹標本を作成し位相差顕微鏡で顆粒体の有無を調べた。

感染力価の調査

シロモンヤガ、ガンマキンウワバ、アワヨトウを供試して行った。特に、１、２齢幼虫に対する感染力検定にはシロモンヤガとガンマキンウワバを供試した。顆粒体懸濁液は10倍段階希釈し（0.01、0.1、1.0、10、100 μg/ml）、テンサイ葉の両面が均一に濡れる程度に噴霧し、これを風乾した後、同一齢期の間（２日または３

日間）供試虫に摂食させ、その後はウイルス無添加の人工飼料を与えて個別飼育し、発病経過を観察した。なお、外部病徴の認められた幼虫並びに死亡幼虫を合わせて感染個体と見なした。１処理につき、20個体、３反復の試験を行った。

３齢以降の幼虫に対するウイルス接種は、人工飼料の小片に顆粒体懸濁液を滴下し個体別に摂食させる方法で行った。ID_{50}はプロビット法[14]で算定した。

ＧＶ感染による幼虫期間の延長と過剰脱皮

シロモンヤガの２齢と３齢（脱皮24時間以内）幼虫を供試した。ＧＶの接種はハスモンヨトウ用人工飼料に顆粒体懸濁液を混入し、250mg顆粒体／g飼料となるように調整し、幼虫に集団で摂食させる方法で行った。脱皮して次の齢に達した幼虫は、ウイルスを含まない人工飼料を入れた試験管に移して個体別に飼育し、脱皮、体色の変化等の観察を毎日行った。飼育条件は22℃、16Ｌ８Ｄとした。

ＧＶ接種による摂食阻害・早期死亡の判定法

孵化１日後あるいは２齢、３齢脱皮当日のヨトウガ、ハスモンヨトウ、アワヨトウ幼虫を用いて実験を行った。人工飼料を用いた実験は、所定の顆粒体懸濁液を混入したハスモンヨトウ用人工飼料を５mm程度の厚さに塗り付けたアルミ箔あるいはパラフィルムを軽く湿らせたろ紙を敷いた６ｃｍシャーレに納め、約35個体の幼虫を入れて集団で摂食させる方法で行った。幼虫の生長並びに生死を一定時間ごとに観察した。

また、ヨトウガ１齢幼虫に対しては、食草を用いた接種方法も合わせて行った。その場合、顆粒体懸濁液をテンサイ葉の両面が均一に濡れる程度に噴霧し、これを風乾した後に供試虫を同一齢期の間（２日または３日）摂食させ、生長の状態並びに生死を観察した。この実験では、さらにオートクレーブ滅菌した顆粒体懸濁液を処理した区を設けた。１処理につき、20個体、３反復の試験を行った。

ウイルスの圃場散布による効果実証試験

1990年にＸｃＧＶ懸濁液を北海道農業試験場畑作部内のテンサイ圃場に散布し、

シロモンヤガとヨトウガに対する防除試験を行った。同年は圃場における対象害虫の自然発生が少なかったので、室内飼育個体から得られた孵化幼虫を圃場に放飼し、幼虫の定着後散布実験を行った。なお、ヨトウガ第２世代幼虫では自然発生個体群のみを対象に試験を行った。ウイルス散布濃度は、100μg顆粒体／mlあるいは10μg顆粒体／mlとした。ウイルスは背負い式噴霧器を使用し100ﾘｯﾄﾙ／10a相当量を散布した。試験の１区面積は２㎡とし、３反復で行った。散布２週間後に個体数調査を行い、ウイルス病徴の表れた個体を除いた生存虫数によって防除効果を判定した。また、比較のためXcNPV-triの散布を同様に行った。

第３節　結果

顆粒体並びにウイルス粒子の形態

ＳＥＭによる観察の結果、ＸｃＧＶの顆粒体は楕円体で、長さは0.45～0.61μm、平均0.50μmで、幅は0.23～0.29μm、平均0.26μmであった(Fig. 20)。顆粒体は、NaOH添加直後にほぼ透明となり、最終濃度 0.02 M NaOH、氷中で30分処理するとウイルス粒子のほとんどが遊離した。ＥＭで観察されたウイルス粒子の多くはvirionの状態であったが、envelopeが壊れ始めた状態の粒子やnucleocapsidも観察された(Fig. 21)。アルカリ処理の時間が１時間半を越えるとほとんどの粒子はenvelopeを失ないnucleocapsidの状態で観察された。virionは、棒状でバナナ形に湾曲しており、長さは405 ± 17 nm (371～455 nm)、幅は 69 ± 8 nm (53～98 nm)であった。nucleocapsidは棒状で、長さは 402 ± 23 nm (362～492 nm)、幅は 43 ± 7 nm (30～62 nm)であった。

宿主域の調査

北海道でシロモンヤガ、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からそれぞれ分離されたＧＶの各種害虫に対する病原性の有無は、Table 11に示した。上記６種由来のＧＶはすべてシロモンヤガ幼虫に



Fig. 20. Scanning electron micrograph of XcGV capsules. Bar = 1 μm.

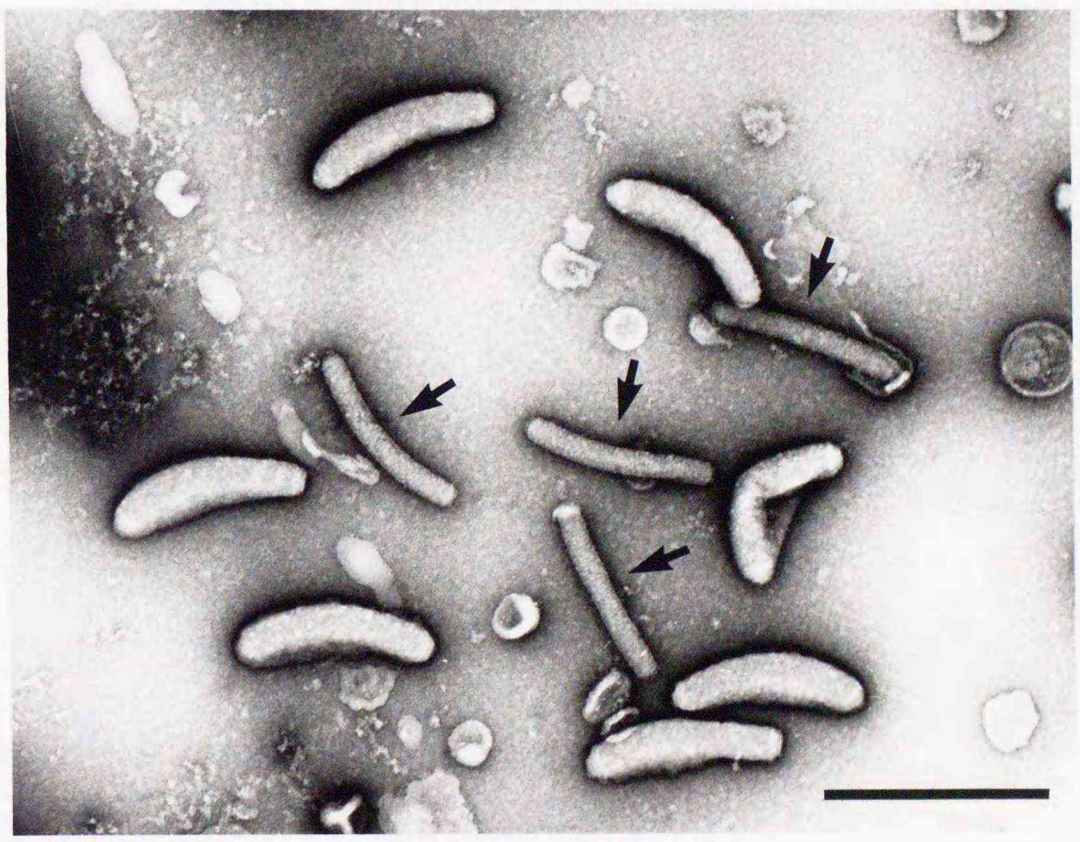


Fig. 21. Electron micrograph of alkali-libarated virions and nucleocapsids of XcGV. Bar=500nm.

Table 11. Cross infectivity of GVs isolated from noctuid larvae

Alternate host	Original host of GV					
	X. c-nigrum	*A. gamma*	*A. pallens*	*H. amurensis*	*C. leucostigma*	*M. separata*
Xestia c-nigrum	+	+	+	+	+	+
Autographa gamma	+	+	+		+	+
Aletia pallens			+			
Hydraecia amurensis						
Celaena leucostigma				+	+	
Mythimna separata	+	+				
Agrotis segetum	–	–	–		–	

病原性を示した。ガンマキンウワバ幼虫に対しては、接種実験を行った５種由来のＧＶすべてが病原性を示した。宿主のうちフキヨトウ等数種は成虫の採集並びに幼虫の飼育が困難なため実験に供試することができず、宿主とＧＶの全組み合わせについて交差感染の有無を調べることはできなかった。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、ショウブオオヨトウの５種を供試した実験では、接種を行った組み合わせすべてで病原性が確認された。第２章で述べた通り、これらのＧＶはゲノムＤＮＡのＲＥＮパターン解析の結果、同一ウイルス、すなわちＸｃＧＶの遺伝子変異株と考えられたが、病原性の試験結果もこれを裏付けるものであった。また、ＸｃＧＶは、これまでの調査による分離宿主以外に、マエジロヤガとフタオビキヨトウにも病原性を持つことが確認された。他方、ヨトウガ、ハスモンヨトウ、タバコガ、シロシタヨトウ、カブラヤガ、ミヤマヨトウ、モクメヨトウでは幼虫のＧＶ感染は観察されなかった。

ＧＶに感染した幼虫は、宿主の種類に関わらずそのほとんどが終齢幼虫まで生存し、罹病末期には体がやや膨大した状態になった。いずれの宿主幼虫においても体色の変化が観察されたが、ガンマキンウワバでは白色化が顕著であったのに対し、アワヨトウ、タンポキヨトウ、オオフタオビキヨトウでは、赤味が増す傾向が認められた。シロモンヤガの場合は、青味がかった白色になる場合と赤味が増す場合との両方が観察された。

ＧＶを接種した個体の多くは幼虫期に体色変化等の病徴が現れ、外観から感染を判別することが可能であった。前蛹化した後に発病する場合があるか否かを調べるためにシロモンヤガ、アワヨトウを用いて、接種個体の９０％程度が発病する濃度でＧＶを接種し、幼虫期で発病せずに前蛹化あるいは蛹化した個体の体液や組織の塗抹標本を位相差光学顕微鏡で観察した。これらの個体では顆粒体は観察されず、前蛹期以降で発病する率は非常に低いものと考えられた。そこで、接種実験の際に前蛹化、蛹化した個体を感染しなかったものと見なしても問題はないものと考えられたので以下の実験では、前蛹化個体は健全個体として処理した。

なお、ヨトウガ、タバコガ、ハスモンヨトウでは、高濃度の顆粒体を接種しても発病個体は得られず、顆粒体が形成された個体も認められなかった。しかし、感染

とは異なる現象として、摂食阻害ならびに生育阻害が観察された。この現象については後に述べる。

各宿主に対するＸｃＧＶの病原性

シロモンヤガ、ガンマキンウワバとアワヨトウの各齢幼虫に対するＸｃＧＶの病原性調査の結果は、Table 12に示した。２齢幼虫の場合、ＸｃＧＶの病原性はシロモンヤガとガンマキンウワバでＩＣ$_{50}$比較で約25倍の差があったが、１齢並びに３齢幼虫ではほぼ同等であった。また、５齢幼虫では、アワヨトウに対するＩＤ$_{50}$はシロモンヤガに対するＩＤ$_{50}$の24倍であった。ガンマキンウワバでは５齢が最終齢にあたるためこの齢におけるＧＶに対する感受性は、４齢以前よりも極端に低く、ＩＤ$_{50}$は100μｇ／個体を越える値となった。なお、予備的に行った若齢幼虫を使った実験ではアワヨトウのＸｃＧＶに対する感受性はシロモンヤガとガンマキンウワバに比べ低い傾向が認められた。

ウイルスによる害虫防除にあたっては、感染力の強弱に加えて接種から死亡までに要する期間の長短が防除効果に大きな影響を及ぼす。そこで、シロモンヤガとガンマキンウワバで行った１、２齢幼虫に対する病原性調査の際に、ウイルス接種濃度によって発病までの経過にどの様な違いがあるかを観察した。顆粒体を１齢で接種した場合は、接種10日前後で外部病徴が現れ始め、２齢で接種した場合は発病を認めるまでの期間はそれより長くなった。また、接種濃度が高いと早く発病する傾向が認められた。ただし、発病しても死亡までにはさらに日数を要し、外部病徴が明らかになっても幼虫が摂食活動を続ける場合が多いことが明らかになった。

感染幼虫の生育遅延と致死日数

前述の試験で、ＸｃＧＶ感染幼虫は病徴の発現までに10日以上を要し、死亡までには更に長い期間がかかることが明らかになった。そこで、シロモンヤガの２齢あるいは３齢幼虫にＸｃＧＶをほぼ100％発病する高い濃度で接種し、感染から死亡までの生育状況を詳しく観察した。実験には顆粒体混入飼料を摂食後次齢に脱皮した個体のみを供試した。ウイルス接種から死亡までの観察結果は、Table 13に示した。

Table 12. IC_{50} and ID_{50} values for XcGV in each instar larvae of noctuid species

Host	instar	Infectivity (IC_{50} or ID_{50})	
Xestia c-nigrum	1	1.33	μg/ml
	2	19.65	μg/ml
	3	0.08	μg/larva
	5	0.70	μg/larva
Autographa gamma	1	1.75	μg/ml
	2	0.78	μg/ml
	3	0.05	μg/larva
	4	0.12	μg/larva
	5	>100	μg/larva
Mythimna separata	5	16.61	μg/larva

Table 13. Effect of XcGV infection on development of *X. c-nigrum* larvae

Days required for each larval instar							
Control (n=26)				Infected with GV in 2nd instar (n=29)			
instar	range	mean + S.D.		instar	range	mean + S.D.	
2	3	3.0		2	3-11	4.8	2.2
3	3-4	3.2	0.4	3	3-16	5.5	2.8
4	3-4	3.4	0.5	4	3-13	5.2	2.4
5	4-7	5.3	0.9	5	5-26	8.1	3.0
6	5-9	6.4	0.9	6	6-15	10.6	3.1 (n=14)
				6*	1-30	13.3	7.9 (n=15)
				7	9-20	13.5	4.7 (n=4)
				7*	7-35	16.3	8.6 (n=10)
				8*	2-16	8.0	6.1 (n=4)
Total[1)]	19-24	21.3	1.4	Total[2)]	25-63	45.5	9.2

Days required for each larval instar							
Control (n=24)				Infected with GV in 3rd instar (n=23)			
instar	range	mean + S.D.		instar	range	mean + S.D.	
3	3-4	3.0	0.2	3	3-4	3.1	0.3
4	2-4	3.1	0.5	4	4	4.0	
5	4-5	4.3	0.5	5	4-8	4.8	1.1
6	5-7	5.3	0.6	6	7-16	11.2	2.4 (n=13)
				6*	3-21	13.9	4.7 (n=10)
				7	7-11	9.3	1.7 (n=4)
				7*	1-12	7.2	3.8 (n=9)
				8*	4-11	7.0	3.2 (n=4)
Total[3)]	14-18	15.8	1.0	Total[4)]	15-39	29.9	6.3

1) 2nd instar to prepupa 2) 2nd instar to death
3) 3rd instar to prepupa 4) 3rd instar to death
* larvae died within the instar period

生育不良で早期に死亡したごく少数の個体は、結果から除いてあるが、対照区では供試個体の９０％以上が前蛹化し、ウイルス接種区でも病徴が発現する前に死亡する個体は非常に少なかった。

２齢で接種を行った場合、対照区ではすべての個体が６齢で前蛹化したのに対し、ＧＶ接種区では過剰脱皮する個体が多く、約半数が７齢あるいは８齢になった。対照区では、２齢～前蛹までの期間が19～24日、平均21.3日であったが、接種区では２齢～死亡までに要した日数は最短でも対照区の前蛹までの期間よりも長く、最長は63日、平均45.5日であった。３齢で接種を行った場合も、ＧＶ接種区で過剰脱皮が観察されたが、対照区の３齢～前蛹までの期間とＧＶ接種区の３齢～死亡までの期間の差は、２齢接種の時よりも小さかった。２齢接種では接種15～20日後に、３齢接種では接種11～16日後に体色の変化が確認された。接種区の幼虫で、体色が白っぽくなったり、白色部分と半透明部分がまだら状に見えるなどの外部病徴が認められる時期は、対照区の個体が５齢～６齢になる時期であった。感染幼虫は顆粒体が形成され、外部病徴が明らかになった後も摂食・生長を続け、死亡時には対照区幼虫の最大生育時よりも大きくなっている例も多く観察された。過剰脱皮と幼虫期間の延長の影響を考え併せると、接種区個体の摂食量は、対照区個体の摂食量よりも多いものと思われた。

ＧＶの接種による摂食阻害・早期死亡

感染宿主域調査においてＧＶに感受性を示さなかったヨトウガなどでは、高濃度のウイルスを塗布した飼料を与えた場合試験開始当日に死亡する個体が観察され、ＧＶが感染以外に何らかの作用を及ぼしている可能性が考えられたので、食草スプレー法を用いてヨトウガ孵化幼虫にＧＶを摂食させ発育状態を詳しく観察した。ＧＶ処理葉を与えてから１日目と４日目の幼虫死亡率はTable 14に示した。供試したヨトウガ孵化幼虫のうち、生存個体は試験開始４日目には２齢に発育したが、ＧＶの高濃度処理区では生存率が非常に低くなった。ＸｃＧＶ処理をしたテンサイ葉に接種した場合、幼虫の死亡率は、ＧＶ濃度 0.01～10μg／mlでは13％～27％であったが、100μg／mlの濃度では78％と高い値を示した。なお、オートクレーブ処理し

Table 14. Mortality(%) of neonate larvae of *M. brassicae* fed on sugarbeet leaves treated with the capsule suspension of XcGV

	Days after treatment	Concentration of capsules (μg/ml)					
		0.0	0.01	0.1	1.0	10.0	100.0
Row capsules	1	0	0	0	0	0	0
	4	1.7a	20.0b	26.7b	13.3a	26.7b	78.3b
Autoclaved capsules	1		0	0	0	0	0
	4		8.3a	11.7a	6.7a	8.3a	1.7a

Mortality in a lane followed by the same letter are not significantly different ($p<0.05$; LSD test)

た顆粒体を用いた場合は幼虫の死亡率は10%程度で無処理の場合と有意差がなかった。この後、2齢まで発育した幼虫にウイルス無添加の人工飼料を与え飼育を続けたところ健全に発育を継続し、ＸｃＧＶの発病は認められなかった。

同様の目的で、ハスモンヨトウ、ヨトウガ、アワヨトウの若齢幼虫にＧＶ顆粒体を混合した人工飼料を与えて発育状態を観察した。ＧＶを含む飼料を与えた区では発育の停止や、死亡率の上昇が観察された。ハスモンヨトウ、ヨトウガの孵化幼虫では、顆粒体の添加量を500μg／g飼料にした場合、2日後の死亡率は90%以上であった。ヨトウガでは、顆粒体添加量が100μg／g飼料の場合でも死亡率は100%であったが、ハスモンヨトウでは顆粒体添加量の減少に従って死亡率は徐々に低下した。接種66時間後の各幼虫の死亡率は Fig. 22に示した。死亡率の高かった区の人工飼料には食痕がほとんど認められず、糞の量も非常に少なかった。死亡時、幼虫の大きさは接種開始時とほぼ同じで、発育あるいは摂食が阻害された結果死亡したものと考えられた。2齢以降の幼虫を用いた試験では死亡率は低かったが、飼料への顆粒体添加量に応じて生育の遅れが大きくなった。アワヨトウでは、顆粒体添加区で無添加区に比べ発育の遅れが認められたが、孵化幼虫を供試した場合でも死亡率は上記2種よりもかなり低い結果となった。死亡率の上昇や生育の遅延といった現象は、特に孵化幼虫を供試した場合に著しく、ＧＶの添加量が増加するにつれ阻害作用が強まる傾向が認められた。

ウイルスの圃場散布による効果実証試験

テンサイ圃場におけるＸｃＧＶの防除試験の結果は、Table 15に示した。この試験では、シロモンヤガまたはヨトウガの孵化幼虫を圃場に放飼し、定着後にウイルスを散布して、16日あるいは18日後に外観から識別できたウイルス病感染個体を除いた生存虫数を調べる方法で行った。シロモンヤガの第1世代では、ＸｃＧＶの散布によって生存虫数は対照区よりも有意に低くなり、有効な防除効果を示した。また、第2世代に対する効果は第1世代よりやや劣ったが有効であった。同時に行ったＮＰＶ散布実験では、生存虫数はＸｃＧＶ散布よりもやや少ない傾向が認められたが、防除効果はＸｃＧＶとほぼ同等であった。ＸｃＮＰＶ-triとＸｃＧＶのヨト

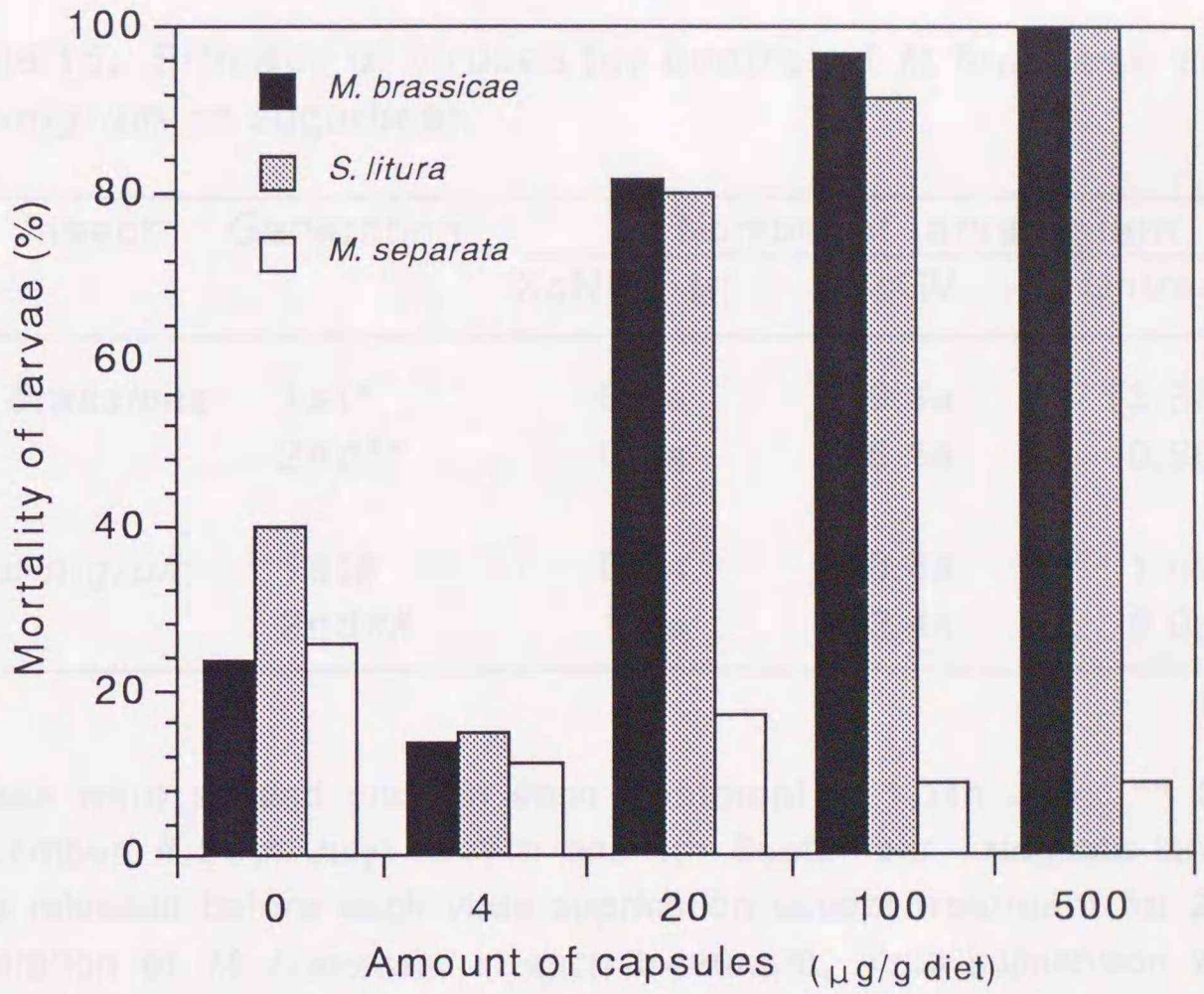


Fig. 22. Mortality of *Mamestra brassicae*, *Spodoptera litura* and *Mythimna separata* larvae fed on an artificial diet mixed with capsules of XcGV for 66 hr from day-1 of 1st instar. Each treatment had 33 to 40 larvae.

Table 15. Efficacy of viruses for control of *M. brassicae* and *X. c-nigrum* on sugarbeet.

Insect	Genaration	Number of larvae/plant		
		XcNPV-tri	XcGV	Untreated
M. brassicae	1st*	6.0a	9.4a	13.6b
	2nd**	0.0a	0.1a	0.8b
X. c-nigrum	1st#	0.0a	0.4a	1.6b
	2nd##	1.6a	2.4a	6.0b

Viruses were spraied once in each treatment in * 7th July; ** 5th September; # 23th July; ## 7th and 8th September. Neonate larvae were released before each virus appricaton except treatment for 2nd generation of *M. brassicae*. In each treatment, virus suspension was spraied at a rate of 100 l/10a. Concentrations of virus suspension were 2.5×10^8 polyhedra/ml for XcNPV and 100 μg capsules/ml for XcGV in treatments for the 2nd generation of *M. brassicae*, and 2.5×10^7 polyhedra/ml for XcNPV and 10 μg capsules/ml for XcGV in the others. Data followed by the same letter are not significantly different at the 0.05 % level(LSD).

ウガに対する効果を比較するとＮＰＶの方がやや高い傾向が見られたが、有為差は認められなかった。

第４節　考察

ウイルス粒子並びに顆粒体の形態

ＧＶの顆粒体はカプセル形あるいは長卵形で通常大きさは短径120～300nm、長径300～500nmである[1, 24]。ＸｃＧＶの顆粒体の大きさは、この範囲のほぼ上限といえる。シロモンヤガと同じヤガ科の昆虫から分離されたＧＶには、ＴｎＧＶ[49]やＰｕＧＶＨ[131, 136]のように顆粒体の大きさがＸｃＧＶとほぼ同等のものが知られており、ヤガ科のＧＶでは長径0.5μm程度の顆粒体を持つグループが存在するとも言える。

本実験では、顆粒体のアルカリ溶解に0.02M NaOHを使用したが、処理時間が１時間を過ぎるとほとんどのvirionはenvelopeを失ったことから、この条件はウイルス粒子の形態を保持するには、やや強すぎる条件であったと思われる。ＥＭ観察にはvirionとnucleocapsidが混在するアルカリ処理30分サンプルを供試したが、virionのほとんどが湾曲しており、特にenvelopeが崩れ始めている粒子で湾曲の度合いが強い傾向が認められたことから、アルカリ溶解や染色によって形態的な変化が起きていることも考えられる。なお、このような湾曲はAckermann & Smirnoff (1983)[1]によって C. fumiferana、C. murinana とExartema appendeciunのＧＶのウイルス粒子でも観察されている。ＥＭ観察により、ＸｃＧＶの virionは、405 × 69 nm、nucleocapsidは 402 × 43 nm と計測された。ＸｃＧＶの virionの大きさは、ＰｕＧＶＨ[131]とほぼ一致していたが、Ackermann & Smirnoff (1983)[1]による５種ＧＶの計測結果と比較すると、幅はほぼ同等あるいはＸｃＧＶの測定値の方が小さいが、長さはＸｃＧＶの方が100nm程度大きかった。第２章でＸｃＧＶのゲノムＤＮＡの分子量が他のＧＶに比べ大きいことを述べたが、ＤＮＡ量の多さがＤＮＡを内蔵しているウイルス粒子の大きさに影響している可能性は高いものと思われる。

宿主域の調査

第２章における遺伝子解析の結果、シロモンヤガ、ガンマキンウワバ、ショウブオオヨトウ、タンポキヨトウ、アワヨトウ、フキヨトウの６種から分離されたＧＶが同一ウイルスの変異株として位置づけられることを示したが、幼虫を用いての接種実験でもＸｃＧＶは供試した１４種のうち７種に感染することが明らかになった。宿主昆虫は、ヤガ科の少なくとも５亜種にまたがっており、ＸｃＧＶはＧＶとしては広い宿主域を持つと言える。交差感染を完全に証明するためには接種幼虫から分離したＧＶを更にＲＥＮ法で分析して確認しなければならないが、第２章で得られた各株の分析結果と、第３章で行った感染実験で得られた結果を考え合わせ、ＸｃＧＶの宿主域を上記のように推定しても問題はないと考えられる。

過去に研究されたＧＶの多くはごく狭い宿主域を持つウイルスであったため、これがＧＶの一般的特性とされており[29,60]、ＧＶが多種類の昆虫に感染性を示した例は少ない。しかし、Tanada & Omi(1974)[138]はA. californica、P. unipuncta、Spodoptera exigua、T. niの各幼虫にカリフォルニアのアルファルファ圃場の土や植物体を経口接種して得られた発病個体から分離したＧＶが交差感染することを確認しており、Federich(1978)[36]も Scotogramma trifoliiから分離したＧＶが A. californicaとT. niに感染性を示したことを報告している。この年代にはウイルスの種や系統を調べる手法がまだ開発されていなかったため分離ＧＶ間の近縁性は明らかではないが、これらの報告は宿主域の広いＧＶの存在を示唆していると言える。また、ＰｕＧＶＨについては血清学的な実験によって数種昆虫への交差感染が確認されている[20]。「ＧＶの宿主域は狭い」という認識は、これまでに分離され研究されてきたＧＶによる様々な実験の結果に基づくものであろうが、その認識が逆に広範囲の接種実験を妨げる原因になった可能性も否定できない。多数のウイルスが新たに分離され感染特性の調査が行われた時代はまだ昆虫の飼育技術が十分に確立されておらず、接種実験に供試できる昆虫種が限られていたこともＧＶの宿主域が狭く見積もられた一因と考えられる。宿主域については、今後多数のＧＶを用いて十分な実験がなされた上で検討すべきであるが、属を越えた宿主域を持つＧＶが複数存在していることは否定できない。

本研究でＸｃＧＶの宿主であることが確認された種のうち、アワヨトウはＰｕＧＶＨにも感染する[58]。従って、アワヨトウはＰｕＧＶＨとＸｃＧＶの共通の宿主であると言える。しかし、接種実験の結果、ＰｕＧＶＨはＸｃＧＶの分離宿主であるシロモンヤガには感染性を示さず、これら２種ＧＶの宿主域は異なるものと考えられる。

感染力の調査

シロモンヤガとガンマキンウワバに対するＸｃＧＶの病原性は、２齢幼虫で差が認められたものの１、３齢ではほとんど差がないところから、ほぼ同等であると考えられた。２齢幼虫の結果を比較すると、シロモンヤガはガンマキンウワバより感受性は低いがやや早く発病する傾向が認められた。従って、シロモンヤガで十分な発病率が得られる量のＧＶを接種することによりガンマキンウワバでもシロモンヤガと同様の殺虫効果が期待できるものと考えられる。シロモンヤガとガンマキンウワバでは、ＧＶが死亡原因として主要な位置を占めており、野外で顆粒病の流行も観察されていることから、これら２種宿主に対してＸｃＧＶが高い感染力を持つことが期待されたが接種実験の結果はこれを裏付けるものであった。他方、アワヨトウのＸｃＧＶに対する感受性はシロモンヤガやガンマキンウワバに比べかなり低かった。1987年には北海道のほぼ全域でアワヨトウの大発生が見られ、十勝地方でも多数の幼虫が発生した[96, 97]が、病気の流行は観察されていない。ＧＶ並びにその他の病気の発生が認められなかった原因としては、幼虫が発生した場所が輪作が体系化している小麦圃場であったため病原の蓄積が少なかった、あるいはアワヨトウ幼虫はＸｃＧＶに対する感受性が前２種に比べて低いため感染が起こりにくかったなどが考えられる。

ＧＶ感染による幼虫期間の延長と過剰脱皮

致死日数つまりウイルス接種から死亡までに要する時間は、害虫防除の効果を考える上で非常に重要である。ＸｃＧＶ接種後のシロモンヤガ幼虫の外観の変化や脱皮などの生長の経過を毎日個体別に記録した結果、２または３齢で接種した場合は

5齢期に達してから病徴が明らかになること、大半の個体は6齢まで生存して健全虫を越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7齢または8齢に達する（過剰脱皮する）ことが明らかになった。ＧＶ感染個体が長期間生存し、健全個体よりも大きくなる現象はＰｕＧＶＨ[131]やＴｎＧＶ[49]でも観察されているが、感染幼虫の過剰脱皮は知られていない。ここで観察された幼虫期間の延長や過剰脱皮は、ウイルス感染によって生じた蛹化の遅延あるいは阻害であると考えることができる。ＮＰＶは脱皮ホルモンの代謝関連酵素遺伝子を持ち、その発現によって感染幼虫の脱皮を阻害することが知られている[98, 99]が、ＧＶは幼虫期間の延長や過剰脱皮といったＮＰＶとは異なる様式で、宿主の生長や変態に関わる物質の制御を行っているものと考えられる。

定量的な実験は行わなかったが、感染幼虫は健全幼虫に比べ摂食期間が長く、また体重も重くなる傾向が認められたことから、感染幼虫の摂食量は健全幼虫以上であることが予想される。病徴の発現につれて行動が鈍くなり、体色が白色化することから、野外では地上に落下したり鳥などに捕食されて死亡する率が増える可能性はあるが、感染幼虫の食害量や加害期間は健全虫と同等かそれ以上になるものと思われる。従って、ＧＶ接種による作物被害軽減効果はさほど期待できないものと思われる。しかし、宿主の生長に従ってウイルスの生産量は多くなり、病原の蓄積量が増加することから、次世代以降の害虫密度を抑制する効果は高いと期待される。

ＧＶの接種による摂食阻害・早期死亡

宿主域を調べるために、各種害虫の若齢幼虫に高濃度の顆粒体懸濁液を塗布した食草や人工飼料を与えた場合、接種後ごく早い時期にウイルス感染とは異なる症状で死亡する個体が観察された。この現象はアワヨトウ、シロモンヤガ、ガンマキンウワバなどＧＶに感染することが明らかな宿主ではほとんど見られない。そこで顆粒体には、感染とは別の何らかの殺虫作用があるのではないかと考え、ヨトウガ、ハスモンヨトウ、アワヨトウを用いて接種実験を行うことにした。顆粒体懸濁液を塗布した食草または懸濁液を練り混ぜた人工飼料を若齢幼虫に与えた場合、ヨトウガ＞ハスモンヨトウ＞アワヨトウの順でより顕著な摂食阻害が観察され前2種では

顆粒体量に従って死亡率も高くなった。死亡した幼虫ではほとんど生長が認められないことから、ごく少量の餌の摂取により摂食阻害作用が起きる、あるいは強い忌避作用が働くものと考えられる。供試した３種のうち、ＧＶに感受性を持つアワヨトウでは生育の遅延は認められたものの生育阻害の程度が最も弱かったことは非常に興味深い。病原微生物の非宿主に対する影響について報告した論文は非常に少ないが、Orlob et al.(1973)[100]は、オオモンシロチョウＧＶの顆粒体やgranulin、遊離のvirionをアブラムシに経口並びに経皮接種して高い死亡率が得られたことを報告している。また、ＮＰＶでも経口で大量の多角体を非宿主に接種すると、生育異常が生じる場合が認められている（前田　進、私信）。ウイルスは一般に病原としてのみ認識されているが、ＧＶ顆粒体の中に非宿主に対して何らかの殺虫効果、または生育阻害効果を持つ物質が存在している可能性は否定できない。今後は、ＧＶ顆粒体の食下によって幼虫の消化管等に何らかの変化が生じているかを組織学的に調査し、生育阻害や死亡が生ずる機構を解明していく必要があろう。作用物質は顆粒体に含まれていると思われるが、予備的に行った顆粒体のアルカリ溶解上清を用いた実験では、生育の遅延が観察されたものの死亡率は顆粒体を用いた時よりもかなり低い結果となったことから、この作用に関連する物質はウイルス粒子由来である可能性も考えられる。

齊藤と後藤(1992)[108]は、ＸｃＧＶのテンサイ圃場での散布試験を行って、ＧＶ散布区でヨトウガの個体数が対照区よりも減少する結果を報告していることから、野外試験でもＧＶの非宿主であるヨトウガで上記の様な生育阻害や致死作用が生じている可能性が考えられる。これまで、病原微生物が非宿主に与える影響を詳しく調べた例はほとんどないが、微生物の大量施用が行われる場合を考えると、害虫防除効果のみならず生態系保全の観点からも病原微生物が非宿主生物に与える影響を調査する必要があると思われる。

ウイルスの圃場散布による効果実証試験

本試験の散布ウイルス濃度は、100μg/mlと10μg/mlでシロモンヤガ２齢幼虫のＩＤ50の５倍並びに１／２とやや低く設定してあり、カーボンなど紫外線防御物質

も加えておらず、ウイルスの効果を確認する上では最も厳しい条件で行われた。処理２週間後のシロモンヤガの健全個体数はＸｃＧＶ散布区で対照無散布区に比べ有意に少ない結果となったが、その効果は、同時に行ったＸｃＮＰＶ-triの散布区よりはやや低かった。ＸｃＧＶは外部病徴が表れるまでに25℃条件下でも10日以上を要するため、今回行った２週間後の調査では、発病・死亡率は低く見積もられている可能性もある。条件設定が厳しかったこともあり高い防除効果を得るには至らなかったが、圃場条件でもＸｃＧＶが対象害虫の密度抑制効果を示すことは明らかである。野外条件下でのウイルスの不活化を調べた実験では、ほぼ100％の発病率が得られる濃度のＧＶを散布した場合でも添加剤や紫外線防御剤を加えないと発病率の低下が著しく、散布当日に90％を越えていた発病率は、ポット植えのテンサイでは３日後で70％、圃場では４日後で50％まで低下した（齊藤と後藤、未発表）。今後ウイルス利用による害虫防除技術の実用化を推進するためには、病原性の低下防止が必要であり、紫外線防御剤の添加や散布法等についても更に検討しなければならない。紫外線防御に関しては、染色剤の添加やデンプンでカプセル化する方法などによって高い効果が得られたとの報告があり[63, 114]、これらを応用することで残効性を高めることができるものと期待される。

ＸｃＧＶは接種から死亡までにかかる時間が非常に長く、幼虫は摂食、生長、脱皮を続け、寄生者や捕食者の影響を受けなければ多くの個体が老齢幼虫に達すると考えられる。ウイルスの生産量という観点から見れば有用な性質であり、牧草地など、数年間同一作物が継続して存在する場合は長期的な害虫密度の抑制が期待できる。しかし、蔬菜などの害虫防除を考えた場合、ウイルス接種をしても被害が軽減できないばかりか、健全幼虫よりも長期に食害が続く危険もある。ＧＶ感染幼虫は行動が緩慢になり、また体色も比較的目立つ色彩に変わるため、捕食・寄生など、他の要因による死亡率が罹病に伴って高まる可能性もあるが、致死日数の長さは防除素材としては考慮すべき重大な問題と思われる。顆粒病への感染が、最終的に加害量にどう影響していくかなどの点についても今後明らかにする必要があろう。

第４章　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

第１節　目的

過去の昆虫病原性ウイルスによる害虫防除試験の結果から、ウイルスの実用化を推進するためには防除効果の向上と生産コスト低下が重要であることが指摘されている[75]。一般に、ウイルスは原宿主（そのウイルスの分離源の宿主）に対して高い感染性を示すが、他の宿主に対しては低い感染性しか示さない場合が多く[7]、広い宿主域を持ち、それらの宿主に一様に強い感染性を持つようなウイルスの探索は容易ではない。また、同一ウイルスの変異株の中から特に強い感染性を持つ株が見いだされた例はほとんど知られていない。もし、既存の昆虫病原性ウイルス、特にＮＰＶの感染力を高める作用を持つ物質が発見されればウイルス利用による害虫防除の効果向上が可能となり、その実用化が大きく進むものと期待される。これまでは、高い感染性を持つウイルスで防除への実用化が検討されてきたが、感染力を強化する方法が開発されれば、感染力が不十分なため防除素材には不適と見なされてきたウイルスに関しても利用の可能性を広げることができる。これらの観点からウイルスの感染力を増強させる化合物の探索が行われ、ほう酸等の薬品[113]やレシチン等[139]による感染力の増強効果が報告された。このような化学物質以外では、アワヨトウの近縁種である P. unipunctaから分離されたＰｕＧＶＨがＮＰＶとの混合感染でＮＰＶの感染力を増強する作用を持つことが報告されている[130, 132]。この作用に関する研究は、Tanadaらのグループによってその後30年間にわたって続けられ、作用活性物質の分離精製並びに作用特性の解明が行われた。Tanada(1956)[130]の報告以来、同様の効果を期待する研究者らによって、様々な宿主とウイルスを用いた混合感染実験が行われたが、その後、感染力の向上が見られた例は無く[12, 81, 82]、ＰｕＧＶＨは特殊な例であるとの認識を強める結果となった。しかしながら、Derksen & Granados(1988)[30]がＴｎＧＶにＮＰＶの感染力を増強する効果があることを報告し、同時期に Goto(1990)[41]が北海道で分離されたＸｃＧＶに同様のＮＰＶ感染力増強効果があることを確認したことで、感染力増強物質を用いた害虫のウイルス防除に対する関心は再び高まりつつある。感染力増強作用の発見は、

日本で分離されたウイルスではＸｃＧＶが初めてであり、本研究は全世界での３例目の報告である。本章では、ＮＰＶの害虫防除機能の向上を目指し、複数の宿主やウイルスを用いてＸｃＧＶの感染力増強活性を調べるとともに、感染力増強物質の分離精製を行った。

第２節　実験材料および方法

供試昆虫

実験には、シロモンヤガ、ガンマキンウワバ、ヨトウガ、アワヨトウ、タバコガを供試した。供試虫の飼育は、タバコガも含め第１章と同様に行った。なお、中齢以降の幼虫の飼育には、いずれの種に対してもハスモンヨトウ用の人工飼料を使用した。

供試ウイルス

実験には、ＸｃＧＶα並びにXcNPV-tetra、XcNPV-tri、MbNPV(T)（阿久津喜作氏がヨトウガから分離したＮＰＶ、九州大学農学部河原畑　勇博士から分譲いただいた）を供試した。ＸｃＧＶαとXcNPV-tetraはシロモンヤガ幼虫で、XcNPV-tri、MbNPV(T)はヨトウガ幼虫で増殖して供試した。ウイルス封入体の精製は、主に分別遠心法で行い必要に応じて密度勾配遠心法を併用した。

感染力増強作用検定用顆粒体並びに顆粒体アルカリ溶解上清の調整

ＮＰＶ感染力増強作用を調べるため、ＧＶ顆粒体を以下のとおり処理した試料をＮＰＶに添加し、接種実験を行った。

①顆粒体を滅菌水に懸濁。

②顆粒体を滅菌水に懸濁後加温処理し、直ちに冷却。

③顆粒体をアルカリ溶解処理（0.02M NaOHで30分～１時間）した後、超遠心分離を行い(10,000 g、15分間）ウイルス粒子を沈澱除去して得た上清に1M Tris-HCl

を加え、最終濃度 50mM、pH 8.0に調整。

④③をS-300Sephacrylカラムクロマトグラフィー（後述）で分画。

⑤④をDEAEセルロースイオン交換カラムクロマトグラフィー（後述）で分画。

生物検定法

ＮＰＶ多角体懸濁液に上記の①～⑤を添加したものを接種原として幼虫に接種して、ウイルス感染の状況を観察した。

集団接種：若、中齢幼虫を用い、葉面散布法では食草の両面が均一に濡れる程度に接種原を噴霧あるいは塗布して風乾したもの、人工飼料混入法では接種原を混入した人工飼料をそれぞれシャーレ内に置き、幼虫を20～30個体入れ集団で24～48時間摂食させた。

個別接種：中～老齢幼虫を用い、24穴マルチウエルプラスチックプレートの各穴に接種原を滴下した人工飼料小片と幼虫１個体を入れ、24～48時間で飼料を食べ尽くした幼虫を実験に供試した。

ウイルス接種終了後、幼虫をウイルス無添加の人工飼料を入れた試験管に移し、個別に飼育して生育と感染状況を観察した。死体は必要に応じて光学顕微鏡で観察した。

タンパク質のＳＤＳ－ＰＡＧＥ

顆粒体の構成タンパク質の分離は、顆粒体を上記の③～⑤の通り処理したサンプルを、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（ゲル濃度7.5～10%）[78]にかけて行い、クマジーブリリアントブルーで染色して観察した。

感染力増強物質の単離・精製

上記③で調整した顆粒体上清を50mM Tris-HCl（pH8.0）で平衡化したSephacryl S-300 superfine カラム（ファルマシア（2.5cm×65cm）に添加、流速0.9ml／minで同溶液により溶出した。各画分の感染力増強活性を生物検定によって調べ、活性画分を濃縮し、さらに同一条件でゲルろ過した。２回のゲルろ過により得られた活性

画分を再度濃縮し、1mM Tris-HCl(pH8.0）で透析後、同緩衝液で平衡化したＤＥＡＥ－セルロースカラム（11.6cm×14cm）に添加、0.0～0.5M NaCl（同緩衝液中）の濃度勾配で溶出した。

カラムクロマトグラフィー画分の感染力増強作用の生物検定

アワヨトウ５齢幼虫を供試し上記の個別接種法により生物検定を行った。ただし、人工飼料の小片にはＭｂＮＰＶ(T)多角体懸濁液とクロマトグラフィーで得られた画分を混合した液を滴下して用いた。13～16日後にＮＰＶ感染の有無を調査した。

第３節　結果

シロモンヤガ４、５齢幼虫に対するＸｃＧＶとＸｃＮＰＶ-tetraの混合接種の結果は、Table 16に示した。感染力増強指数はHukuhara et al.（1987）[58]に従って算出した。４齢幼虫で接種した場合は、増強指数は0.1以下で、処理によってはマイナスの値をとり、ＧＶの添加によってＮＰＶの感染率が低下する結果となった。５齢幼虫で接種した場合、増強指数はすべて１以上となり、感染率の上昇が認められた。この実験では、ＸｃＧＶの顆粒体接種量を0.5～5.0μg／個体とした場合ＸｃＮＰＶのＩＤ$_{50}$は12～240分の１の値となったが、顆粒体接種量の増加はＮＰＶの感染力増強には直接結びつかない結果となった。なお、Table 16の ＊ 印で示した実験については、それぞれのウイルスの感染状況を個体別に調査しTable 17に示した。位相差顕微鏡観察で診断できる範囲では、１個体から双方のウイルスの封入体が観察された例（表中ではＮＰＶ＋ＧＶで表示）は少なく、一方のウイルスの封入体のみが検出される例が多かった。４齢幼虫では、顆粒体接種量を増加してもＮＰＶ感染率は上昇せず、顆粒体接種量を5.0μg／個体とした場合にはＧＶの感染率が高くなりＮＰＶ感染率が抑えられる結果となった。５齢幼虫では、顆粒体接種量が5.0μg／個体以下の場合には顆粒体の添加によってＮＰＶ感染率の上昇が認められたが、顆粒体が40μg／個体の場合は顆粒病感染率が80%を越えて、逆にＮＰＶ感染が抑え

Table 16. Enhancement of NPV infection in *X. c-nigrum* by mixed infection with XcGV

Larval stages	Inoculum	ID_{50} (polyhedra/larva)	Enhancement Index $\log_{10}$	No. of larvae in each treatment
4th	NPV	5.58×10^4	_	13-19
	NPV+GV(1.0 μg/larva)	4.42×10^4	0.10	8-19
	* NPV	3.65×10^4	_	14
	* NPV+GV(0.5 μg/larva)	4.17×10^4	-0.06	14
	* NPV+GV(5.0 μg/larva)	4.18×10^5	-1.06	14
5th	NPV	5.01×10^5	_	24
	NPV+GV(1.0 μg/larva)	4.37×10^4	1.06	24
	NPV	1.04×10^5	_	21
	NPV+GV(1.0 μg/larva)	7.67×10^3	1.13	21
	* NPV	4.54×10^5	_	15
	* NPV+GV(0.5 μg/larva)	1.89×10^3	2.38	15
	* NPV+GV(5.0 μg/larva)	1.54×10^4	1.47	15
	NPV	3.53×10^5	_	11
	NPV+GV(5.0 μg/larva)	2.92×10^4	1.08	11

* Results of microscopical diagnosis are shown in Table 17.

Table 17. Susceptibility of larvae of *X. c-nigrum* to NPV and GV

Larval instars	Inoculum (per larva)		No. of larvae				Percent infected with	
	NPV(No. of Polyhedra)	GV(μg capsules)	with NPV	with NPV+GV	with GV	not infected	NPV	GV
4th	2.17×10^5	0.0	10	0	0	4	71.4	-
	10^4	0.0	6	0	0	8	42.9	-
	10^3	0.0	3	0	0	11	21.4	-
	10^2	0.0	0	0	0	14	0.0	-
	2.17×10^5	0.5	10	0	3	1	71.4	21.4
	10^4	0.5	5	1	4	4	42.9	35.7
	10^3	0.5	2	0	2	10	14.3	14.3
	10^2	0.5	0	0	1	13	0.0	7.1
	2.17×10^5	5.0	5	1	8	0	42.9	64.3
	10^4	5.0	4	0	8	2	28.6	57.1
	10^3	5.0	1	3	9	1	28.6	85.7
	10^2	5.0	0	0	12	2	0.0	85.7
5th	2.17×10^6	0.0	12	0	0	3	80.0	-
	10^5	0.0	5	0	0	10	33.3	-
	10^4	0.0	1	0	0	14	6.7	-
	10^3	0.0	0	0	0	15	0.0	-
	2.17×10^5	0.5	14	0	0	1	93.3	0.0
	10^4	0.5	10	0	0	5	66.7	0.0
	10^3	0.5	9	1	1	4	66.7	13.3
	10^2	0.5	3	0	0	12	20.0	0.0
	2.17×10^5	5.0	5	4	4	2	60.0	53.3
	10^4	5.0	9	0	5	1	60.0	33.3
	10^3	5.0	6	1	3	5	46.7	26.7
	10^2	5.0	1	1	6	7	13.3	46.7
	1.78×10^5	0.0	9	0	0	11	45.0	-
	10^4	0.0	0	0	0	20	0.0	-
	1.78×10^5	4.0	13	2	5	0	75.0	35.0
	10^4	4.0	9	2	6	3	55.0	40.0
	1.78×10^5	40.0	1	1	16	1	10.5	89.5
	10^4	40.0	0	0	16	4	0.0	80.0

られる結果となった。

アワヨトウ５齢幼虫に対するＸｃＧＶとMbNPV(T)の混合感染の結果は、Tabel 18に示した。ＮＰＶの多角体に顆粒体を10.0μg／個体添加して接種した場合ＩＤ$_{50}$は10^3多角体／個体レベルとなり、感染力は約1000倍強化された。この実験における顆粒体接種量は上記のシロモンヤガの場合よりもかなり多いが、アワヨトウではＧＶそのものの感染率は低かった。そこで顆粒体の接種量を増やして混合感染実験を行ったところ顆粒体接種量が20μg／個体までは、顆粒体の増加に従ってＮＰＶ感染率（ＮＰＶとＧＶの双方に感染している個体を含む）が上昇するが、接種量が30μg／個体を越えるとＧＶのみの感染率が高くなり、ＮＰＶの感染率はＧＶ無添加の場合よりも高いもののその上昇は抑えられる結果となった(Fig. 23)。

ヨトウガ５齢幼虫に対するＸｃＧＶとＸｃＮＰＶ-triの混合接種実験の結果は、Table 19に示した。ＸｃＧＶに感染しないヨトウガでも顆粒体の添加によってＮＰＶの感染率が上昇することが確認された。前述のとおり、ＸｃＧＶに感受性のシロモンヤガとアワヨトウでは、顆粒体の添加量を増やすとＸｃＧＶのみに感染する個体が増え、特に齢期の若い個体ではＮＰＶの感染率の上昇が抑えられる現象が認められたので、比較のために、ＧＶに感受性を示さないヨトウガの若齢幼虫を用いて接種実験を行った。２齢幼虫では、顆粒体の添加によってウイルス接種後の生存率が低下し、ＮＰＶ感染率も極端に低い結果となった(Table 20)。３齢幼虫では、ＧＶ添加量が50μg／g飼料を越えない場合はＮＰＶの感染率が上昇する傾向が認められたが、添加量が多くなると幼虫の生育阻害が観察されＮＰＶの感染率も低い結果となった(Table 21)。

ガンマキンウワバについては、２齢幼虫のみを供試し、葉面散布法でＸｃＧＶとＸｃＮＰＶ-triの混合接種実験を行った。この実験では、感染ウイルスの判別は主に死亡の外観によって行い、識別が困難な場合は位相差顕微鏡観察を行った。ＧＶ顆粒体濃度が0.1μg／mlの場合はＮＰＶ感染率がＮＰＶ単独接種の３倍程度に高まったが、顆粒体濃度が0.5μg／mlを越えた場合はＮＰＶ感染率はＧＶ無添加のときとほとんど変わらない結果となった(Table 22)。

ＰｕＧＶＨの感染力増強作用は顆粒体を80℃で10分間処理しても低下しないこと

Table 18. Enhancement of MbNPV(T) infection in 5th instar larvae of *M. separata* by mixed infection with XcGV

MbNPV	Percent infected with NPV in the presence of GV			
(polyhedra/larva)	0	10	0	10 (μg*)
1.6×10^4	12.5	95.8	4.4	75.0
$\times 10^5$	16.7	95.7	12.5	95.7
$\times 10^6$	25.0	100.0	55.0	100.0
$\times 10^7$	65.2	100.0	79.2	100.0
ID_{50}	7.7×10^6		1.7×10^6	

Each treatment had 21 to 24 larvae.

* Dry weight of capsules inoculated per larva.

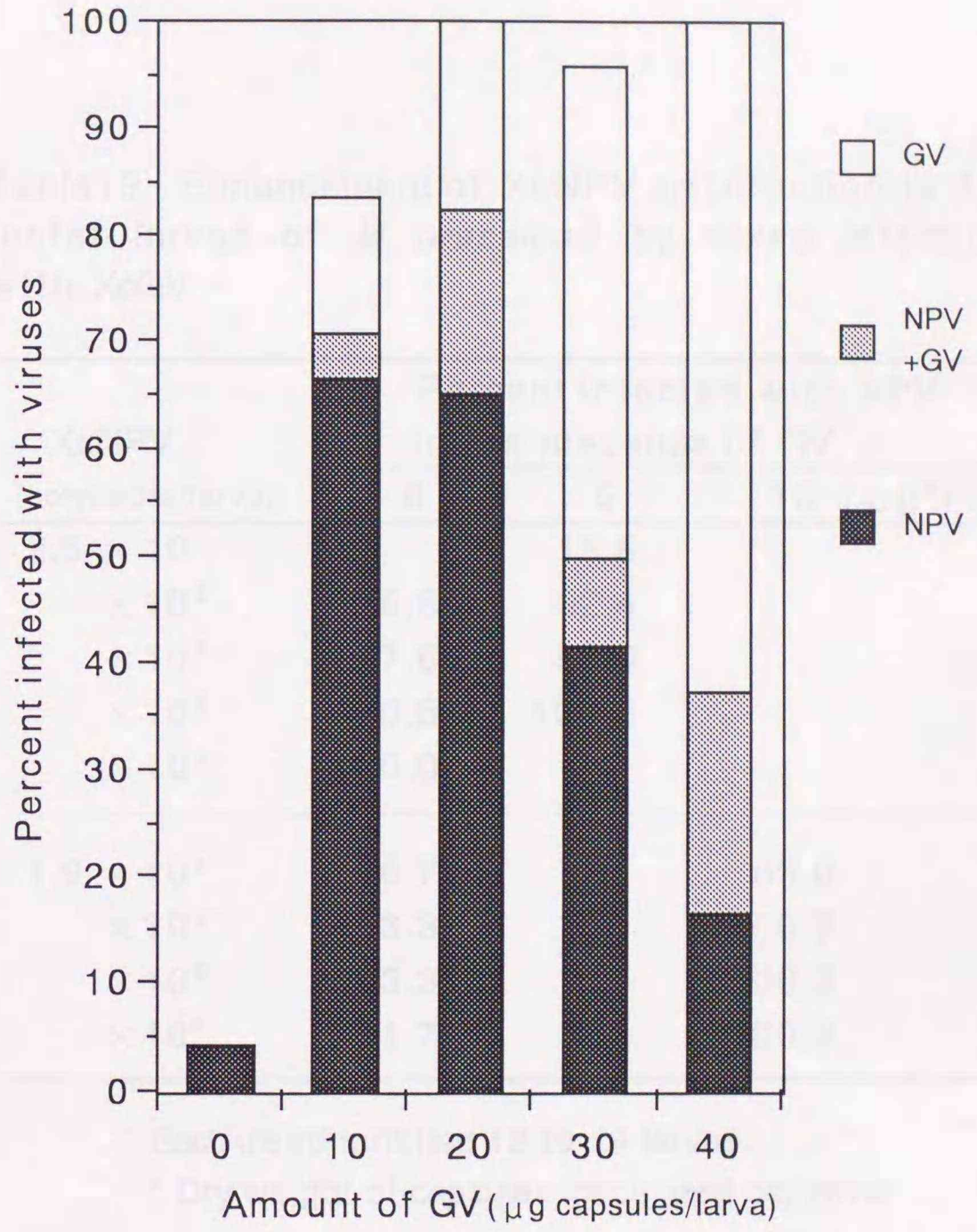


Fig. 23. Enhancing and interfering effect of XcGV on NPV infection in 5th instar larvae of *Mythimna separata*. Each larva was fed a piece of diet contaminated with 1.9×10^5 polyhedra of XcNPV-tri and each amount of XcGV capsules.

Table19. Enhancement of XcNPV-tri infection in 5th instar larvae of *M. brassicae* by mixed infection with XcGV

XcNPV (polyhedra/larva)	Percent infected with NPV in the presence of GV		
	0	5	10 (μg*)
2.5 $\times 10^2$		15.8	
$\times 10^3$	15.8	52.4	
$\times 10^4$	47.6	90.0	
$\times 10^5$	90.5	100.0	
$\times 10^6$	100.0		
1.9 $\times 10^4$	16.7		83.0
$\times 10^5$	33.3		100.0
$\times 10^6$	83.3		100.0
$\times 10^7$	91.7		100.0

Each treatment had 12 to 24 larvae.

* Dry weight of capsules inoculated per larva.

Table 20. Interfering effect of XcGV on growth and NPV infection in 2nd instar larvae of *M. brassicae*.

NPV (polyhedra /g diet)		Percent infected with MbNPV	
		3.9×10^3	3.9×10^4
GV (μg*/ g diet)	0	0.0 (100.0)**	62.1 (17.2)**
	2	6.9 (55.2)	34.5 (10.3)
	10	0.0 (48.3)	3.6 (0.0)
	50	0.0 (3.7)	0.0 (0.0)

* dry weight of capsules

** Percent of 6th instar larvae 15days after inoculation.

Table 21. Enhancing and Interfering effect of XcGV on NPV infection in 3rd instar larvae of *M. brassicae*.

NPV (polyhedra /g diet)		Percent infected with MbNPV	
		3.9×10^3	3.9×10^4
GV (μg*/ g diet)	0	16.7	30.0
	2	16.7	53.3
	10	50.0	60.0
	50	27.6	60.0
	250	13.8+	3.6++

+ and ++ indicate arresting effect on larval groth.

* dry weight of capsules

が報告されている[132]。そこで、ＸｃＧＶについても加温処理した顆粒体を使ってＮＰＶと混合接種実験を行った。アワヨトウ５齢幼虫にＸｃＮＰＶ-triと加温処理した顆粒体あるいは未処理の顆粒体を混合接種した結果は、Table 23に示した。ＸｃＧＶは顆粒体を75℃10分間処理した場合でも、未処理の場合とほぼ同等のＮＰＶ感染力増強作用を示したが、77℃10分間の処理では増強作用は明らかに低下した。

顆粒体アルカリ上清添加による感染力増強

上記の接種実験の結果、ＮＰＶとＸｃＧＶの混合接種を顆粒体を用いて行うと、ＸｃＧＶに感受性の宿主ではＧＶのみに感染する個体の割合が高くなり、ＮＰＶ感染率が低く抑えられる場合があることが明らかになった。そこで、ＧＶ自身の感染力を除外して、ＮＰＶ感染力増強作用を調べるために、顆粒体をアルカリ溶解しウイルス粒子を除いたもの（ＧＶ上清）を用いて実験を行うことにした。なお、ＧＶ上清を用いた場合は、第２章で述べたヨトウガなどＸｃＧＶに非感受性の宿主の若齢幼虫に大量の顆粒体を接種した場合に起きる生育阻害はほとんど観察されなかった。

シロモンヤガ５齢幼虫にＸｃＧＶ上清とＸｃＮＰＶ-triを混合して接種し、ＮＰＶ感染による死亡率を時間の経過を追って調べた。Fig. 24に示す通り、ＸｃＧＶ上清の添加によってＮＰＶ感染による死亡率が上昇し、致死日数は短縮した。ＧＶ上清無添加の場合、接種10日後まではＮＰＶによる死亡は認められず14日後でも感染死亡率は20%に満たなかったのに対し、50μg顆粒体／個体に相当する上清を添加した場合は７日後から、25μg顆粒体／個体に相当する上清を添加した場合は８日後からＮＰＶ感染による死亡個体が認められるようになり、14日後にはいずれの添加区でも死亡率が90%を越えた。次にＧＶ上清添加量によってＮＰＶ感染率がどう変化するかを調べた。Fig. 25に示すように、ＮＰＶの感染率はＧＶ上清の量が増えるに従って直線的に高くなった。

アワヨトウ５齢幼虫とMbNPV(T)を用いて同様の実験を行った。ＮＰＶ感染率はＧＶ上清の添加量が増えるに従って上昇した(Fig. 26)が、ＮＰＶの感染率を上昇させるために必要な上清の量はシロモンヤガ幼虫に比べアワヨトウ幼虫の方が多い傾向

Table 22. Enhancing and interfering effect of XcGV on XcNPV-tri infection in 2nd instar larvae of *A. gamma*.

Inoculum		Percent infected with	
XcNPV*	GV**	XcNPV	XcGV
0	0	0.0	0.0
0	0.1	0.0	10.0
0	1.0	0.0	61.7
2.5×10^5	0	22.5	0.0
2.5×10^5	0.1	64.3	16.7
2.5×10^5	0.5	28.3	33.3
2.5×10^5	1.0	25.0	45.0

* polyhedra/ml;** μg capsules/ml

Table 23. Change in enhancing effect of XcGV capsules on XcNPV-tri infection after heat treatment

	XcNPV	Percent infected with NPV in the presence of GV capsules				
	(polyhedra/larva)	0	2	10	10*	(μg /larva)
	9.5×10^2			33.3	16.7	
	$\times 10^3$	0.0	0.0	50.0	16.7	
A	$\times 10^4$	0.0	20.8	58.3	45.8	
	$\times 10^5$	4.2	25.0	82.6	79.2	
	$\times 10^6$	8.3	54.2			
	9.5×10^2			17.4	0.0	
	$\times 10^3$	0.0	4.2	36.4	8.3	
B	$\times 10^4$	0.0	0.0	58.3	16.7	
	$\times 10^5$	4.2	30.4	77.3	22.7	
	$\times 10^6$	20.8	31.8			

Each treatment had 22 to 24 larvae of *M. separata* (5th instar).

*Capsules were treated at 75℃ in A and 77 ℃ in B for 10 min.

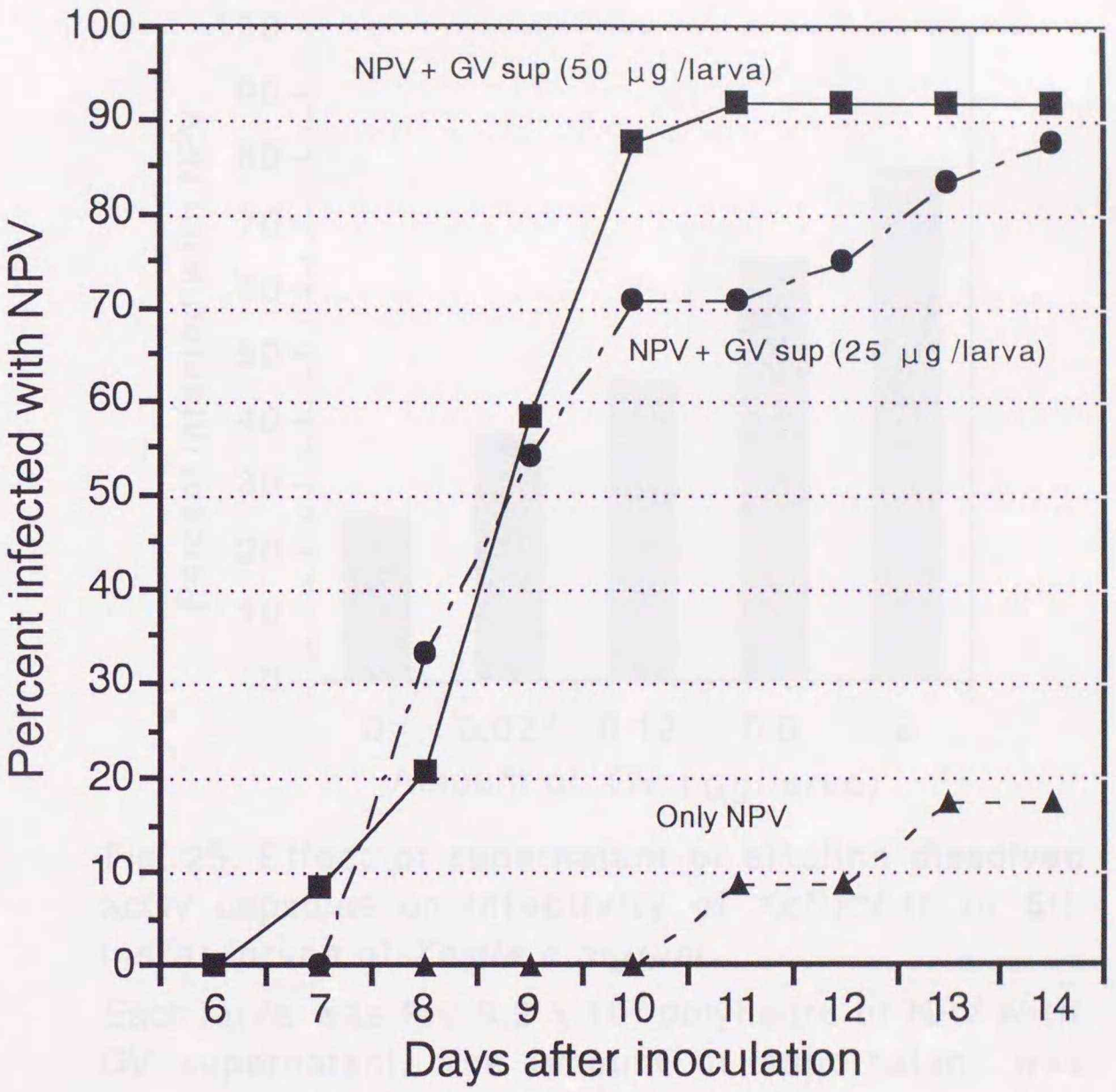


Fig. 24. The effect of XcGV on infectivity of NPV in 5th instar larvae of *Xestia c-nigrum.*

Each larva was fed 5.3 x 10^4 polyhedra of XcNPV-tri with or without supernatant of alkaline dissolved capsules of XcGV (GV sup). The amount of "GV sup" was equivalent to given weight of capsules.

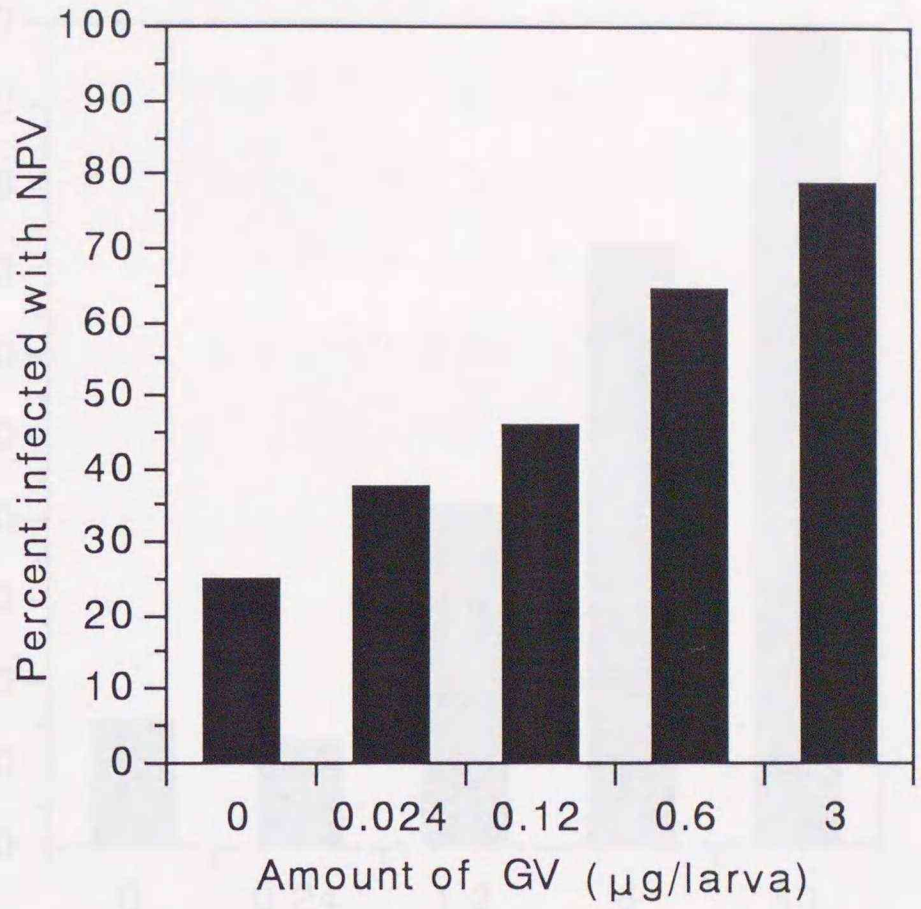


Fig. 25. Effect of supernatant of alkaline dissolved XcGV capsules on infectivity of XcNPV-tri in 5th instar larvae of *Xestia c-nigrum*.

Each larva was fed 3.2×10^5 polyhedra of NPV with GV supernatant. The amount of supernatant was equivalent to given weight of capsules.

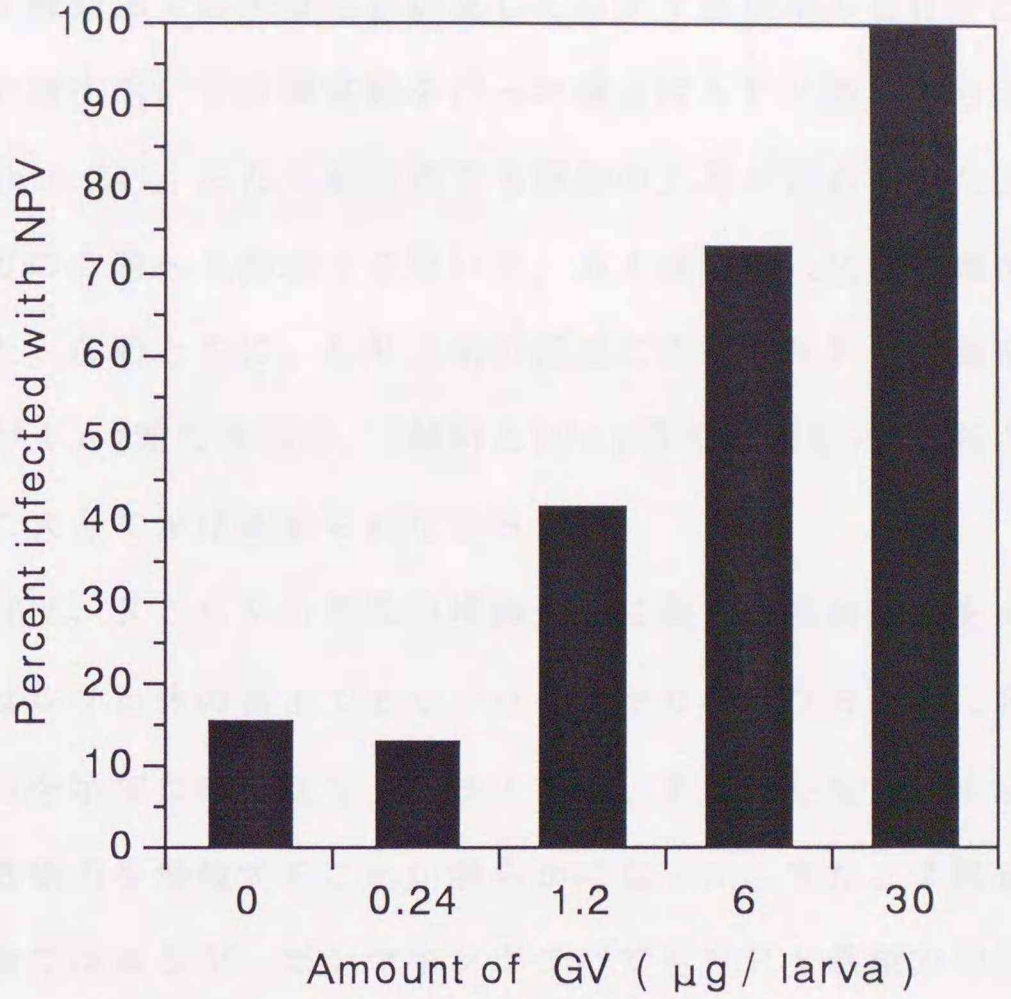


Fig. 26. Effect of supernatant of alkaline dissolved XcGV capsules on infectivity of MbNPV(T) in 5th instar larvae of *Mythimna separata*.

Each larva was fed 3.2×10^4 polyhedra of MbNPV with GV supernatant. The amount of supernatant was equivalent to given weight of capsules.

が認められた。

次にヨトウガ５齢幼虫を用いて同様の実験を行ったところ、ヨトウガ幼虫でもＧＶ上清の添加によりＮＰＶ感染率は大きく上昇した。ＧＶ顆粒体そのものを添加した場合、２齢幼虫では生育阻害が生じてＮＰＶ感染率の変化がはっきりしなかったが、ＧＶ上清を用いて接種実験を行った場合はＮＰＶ感染率の上昇が明らかに認められた(Table 24)。また３齢幼虫でも感染の上昇が認められた(Table 25)。

タバコガの２齢～４齢幼虫を用いて、人工試料混入法で接種を行った結果は Fig. 27に示した。各齢ともに、ＧＶ上清の添加によってＮＰＶ感染率が上昇したが、上清添加量が４μg顆粒体相当／g飼料と20μg顆粒体相当／g飼料との間では感染率の上昇程度に大きな差は認められなかった。

Table 26は、ＸｃＧＶの感染力増強効果に関する実験結果をまとめたものである。ＸｃＧＶはＧＶ自体の宿主であるシロモンヤガ、アワヨトウにおいてＮＰＶの感染力増強作用を示すだけではなく、ヨトウガ、タバコガなど宿主以外の種においてもＮＰＶの感染力を増強することが明らかになった。また、２齢幼虫のみを用いた予備的な実験ではあるが、ガンマキンウワバでもＮＰＶ感染力増強が認められた。一方、ハスモンヨトウでは増強作用は認められなかった。また、ＸｃＧＶは、ＸｃＮＰＶ-tertaとＸｃＮＰＶ-triに加え、ＭｂＮＰＶ(T)に対しても感染力の増強作用を示すことが明らかになった。

感染力増強物質の単離・精製

以上の結果から、感染力増強作用の活性成分は顆粒体のアルカリ可溶画分に含まれることが明らかになったのでSephacryl S-300を用いたカラムクロマトグラフィーで活性成分すなわち感染力増強物質の単離・精製を試みた。ＭｂＮＰＶ多角体にカラムクロマトグラフィーで得られた画分を加えてアワヨトウ５齢幼虫に接種して生物検定を行った結果、分画番号18～22に強い感染力増強活性が認められた(Fig. 28)。SDS-PAGEの結果、この分画は分子量100kDa付近に２本（a、b）のバンドを含んでいた(Fig. 29)。そこで、この画分を濃縮し、再度同様のカラムクロマトグラフィーを行ったが、aとbの成分を分離することはできなかった。そこで、２回のクロマトグ

Table 24. Enhancing effect of supernatant of XcGV capsules on MbNPV infection in 2nd instar larvae of *M. brassicae*.

NPV*	GV sup.**	% infected with NPV
5.4×10^2	0	20.0
5.4×10^2	250	82.6
5.4×10^3	0	84.0
5.4×10^3	250	100.0

* polyhedra/ g diet

** shown as equivalent μg capsules/ g diet

Table 25. Enhancing effect of XcGV supernatant of capsules on MbNPV infection in 3rd instar larvae of *M. brassicae*.

NPV*	GV sup.**	% infected with NPV
5.4×10^2	0	52.0
5.4×10^2	50	68.0
5.4×10^2	250	88.0
5.4×10^2	500	82.6

* polyhedra/ g diet

** shown as equivalent μg capsules/ g diet

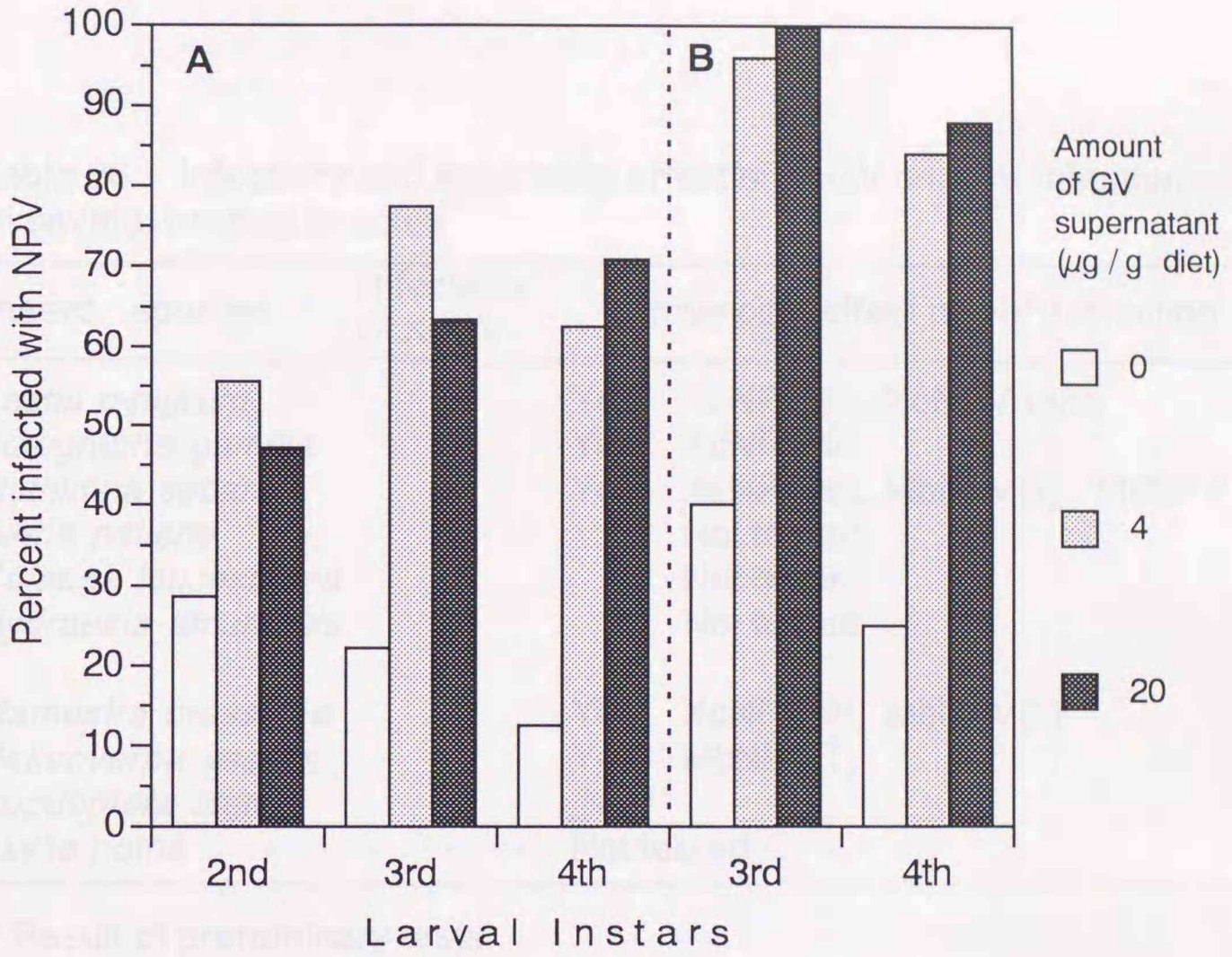


Fig. 27. The Effect of XcGV on infectivity of MbNPV(T) for *Helicoverpa assulta*.

Larvae were fed a lump of diet contained supernatant of alkaline dissolved capsules of XcGV and polyhedra of NPV (A: 3.5×10^2 polyhedra / g diet; B: 3.5×10^3 polyhedra / g diet) for 48hr.

Amount of GV supernatant is shown as dry weight of equivalent capsules.

Table 26. Infectivity and enhancing effect of XcGV on NPV infection in several noctuid species

Insect species	Infectivity of XcGV	Enhancing effect on NPV infection	
Xestia c-nigrum	++	Yes	XcNPV-tri, XcNPV-tetra
Autographa gamma	++	Yes	XcNPV-tri
Mythimna separata	+	Yes	XcNPV-tri, MbNPV(T), MsNPV
Aletia pallens	+		Not tested
Celaena leucostigma	+		Not tested
Hydraecia amurensis	+		Not tested
Mamestra brassicae	-	Yes	XcNPV-tri, MbNPV(T)
Helicoverpa assulta	-	Yes	MbNPV(T)
Spodoptera litura	-	(No)*	
Axylia putris	-	Not tested	

* Result of prereminary tests.

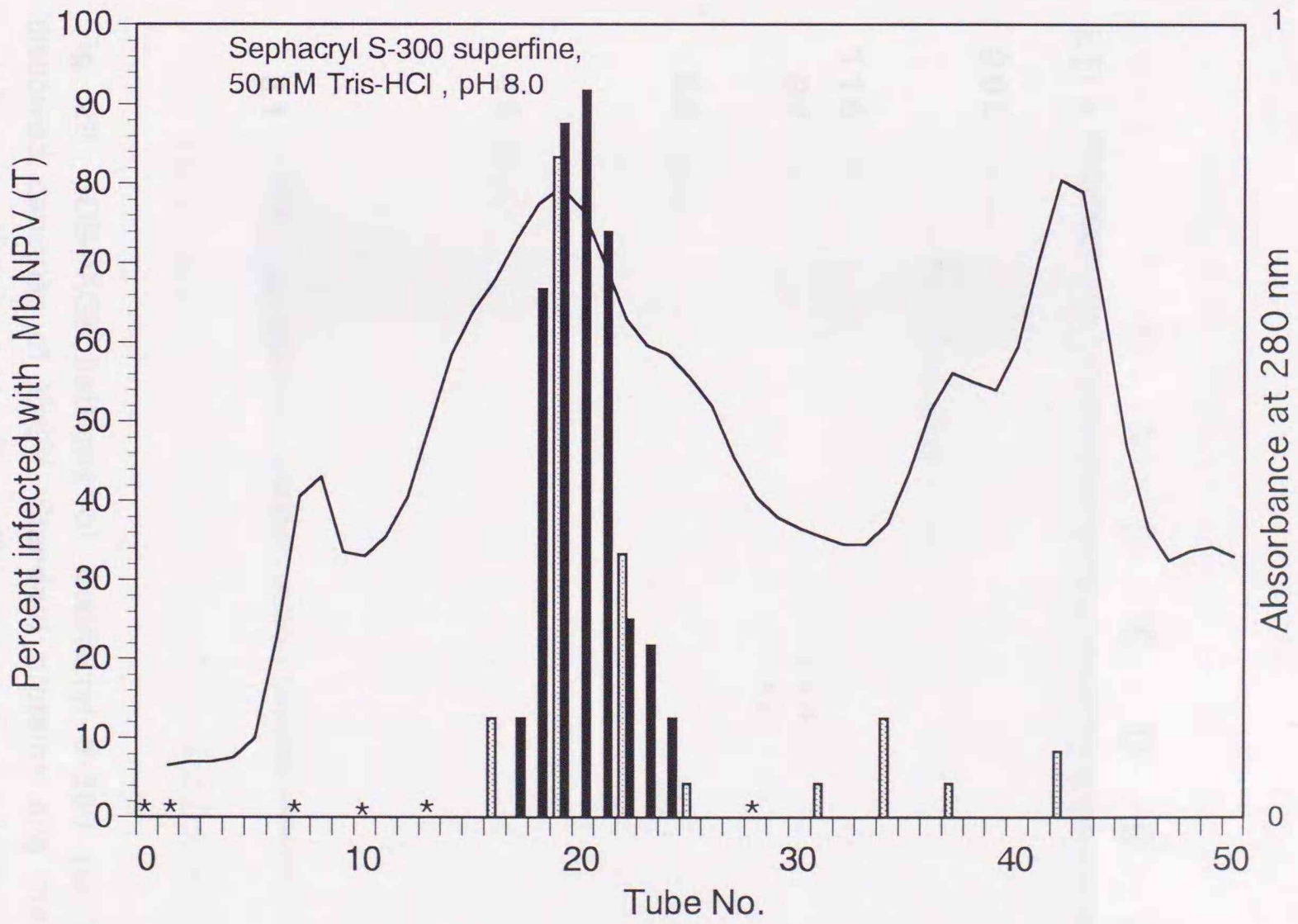


Fig. 28. Profiles and enhancing activity of Sephacryl S-300 gel filtrations of dissolved capsules of XcGV. Enhancing activity of the fractions are expressed by the percentage of larvae with nuclear polyhedrosis. Each fraction (3 μl /larva) was combined with the polyhedron suspension of MbNPV(T) to give a final dose 0.7 x10^5 polyhedra/larva (▨ , *) and 5.5 x10^4 polyhedra/larva (■).

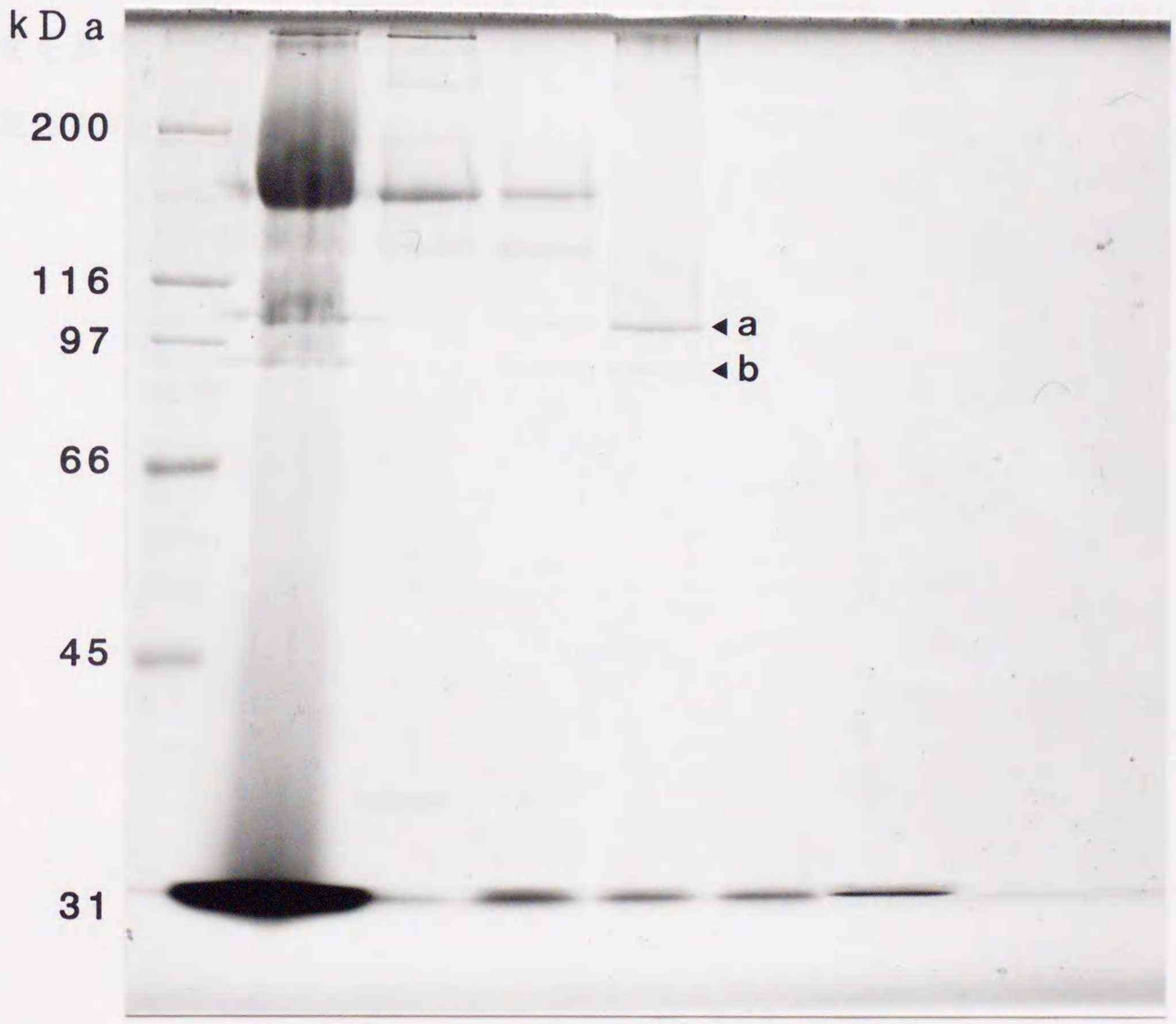


Fig. 29. SDS-PAGE patterns of Sephacryl S-300 gel fractions of dissolved capsules of XcGV. Standard proteins and their molecular weights are shown. Lane S, initial supernatant of alkaline dissolved capsules; lane A, pooled fractions of No. 7 to 8 tubes; lane B, No. 10 to 13; lane C, No. 18 to 21; lane D, No. 24 to 25; lane E, No. 27 to 29; lane F, No. 36 to 38; lane G, No. 42 to 43 (see Fig. 28.).

ラフィーで得られた活性成分を1mM Tris-HClで透析し、濃縮後DEADセルロースによるイオン交換クロマトグラフィーを行ったところ、各成分を単離することができた(Fig. 30)。生物検定の結果、成分 aには強い活性が認められたが、bの活性ははっきりしなかった。a,bの各成分が同じタンパク質に由来するものかどうかを調べるため、両成分をリシルエンドペプチダーゼ処理し、ＨＰＬＣでペプチドマッピングを行ったが、両者には共通するピークはほとんど認められなかったことから２つの成分は異なるタンパク質から構成されているものと考えられた。なお、分子量ﾏｰｶｰの移動度を基準にして分子量を算出したところ、aの分子量は約108 kDa、bは約93 kDaと推定された。



Fig. 30. SDS-PAGE patterns of fractions obtained from sephacryl S-300 filtrations and DEAE-cellulose column chromatography showing separation of two closely adjacent protein compornents of XcGV capsules. Lanes S: initial supernatant of alkaline dissolved capsules.

第４節　考察

ウイルス間相互作用による感染力の増強現象は、Tanada(1956)[130]が行ったＰｕＧＶＨとＰｕＮＰＶの混合感染実験によって発見された。その後、感染力増強物質の特定、単離・精製とその性質の解明は、Hara et al.(1976)[50]、Yamamoto & Tanada(1978 a,b,c)[151,152,153]、Yamamoto et al.(1979)[150]によって進められた。しかし、Derksen & Granados (1988)[30]によってＴｎＧＶにも同様の作用があることが発見されるまで、このような作用を持つウイルスの報告はほとんどなかったことから、ＰｕＧＶＨのＮＰＶ感染力の増強作用は他の研究者には特殊な現象として受けとめられていた。筆者は、Derksen & Granadosとほぼ同時期に北海道で分離されたウイルスであるＸｃＧＶがＮＰＶ感染力増強作用を持つことを発見し、報告した[41]。米国以外の地域から感染力増強作用を持つウイルスが発見されたのは、ＸｃＧＶが初めてである。感染力増強作用を持つ新たなウイルスが発見されたことによって、感染力増強作用の重要性や実用性が再認識され、ＰｕＧＶＨのみを対象としていた感染力増強の研究は、複数の研究グループが異なる由来のＧＶを対象として研究する時代を迎えた。

ＸｃＧＶの分離宿主であるシロモンヤガを用いたＮＰＶとの混合接種実験の結果、５齢幼虫では感染力増強作用が確認されたが、４齢幼虫では増強効果が認められずＧＶの添加を増やすとＧＶのみに感染する個体が増加しＮＰＶ感染が抑えられることが明らかになった。ＰｕＧＶＨでは、齢期が進むにつれて感染力増強の度合いが強くなる傾向があることは報告されている[130]が、ＮＰＶとＧＶ間の干渉作用は知られていない。これに対し、本研究では、ＸｃＧＶはＮＰＶの感染力増強作用を持つ一方、ＧＶ自身の感染が優勢を占めるかたちでＮＰＶの感染を干渉する作用を持つことが明らかにされ、シロモンヤガを始め、ＸｃＧＶの宿主であるアワヨトウ、ガンマキンウワバでも感染力増強と干渉、双方の作用が確認された。この２つの作用は別個の機構によって生じていると考えられ、若齢幼虫への混合接種や中齢以降でもＧＶ添加量が多い場合は、ＧＶ自体の感染力がＮＰＶに対する増強作用を覆い隠す結果になっていたものと思われる。ＸｃＧＶはＮＰＶの感染を上昇する作用と共にＮＰＶの感染を干渉する作用を持ち、ＸｃＧＶとＮＰＶが同時に接種された場

合、シロモンヤガ等ＸｃＧＶに感受性の種では幼虫の発育ステージと両ウイルスの接種量の比によってどちらのウイルスが優勢となるかが決まるものと考えられる。本研究の結果から、混合接種の時期が若いステージの場合はＧＶの感染が優勢となるが、ステージが進むとＧＶに対する幼虫の感受性が低下するためＮＰＶ感染増強作用が強く現れる傾向が認められた。

ＸｃＧＶは、シロモンヤガ、ガンマキンウワバの双方で恒常的に感染が観察されており、野外においてもウイルスとして高い感染性を保っているものと推測され、本研究で認められたＧＶとＮＰＶとの感染の競合は、ＸｃＧＶの高い感染性によるものと考えられる。ＸｃＧＶとＰｕＧＶＨの共通の宿主であるアワヨトウを用いた接種実験を予備的に行ったところ、ＸｃＧＶの感染力は明らかにＰｕＧＶＨを上回っていた。1958～1960年にハワイで行われた野外調査では、P. unipuncta幼虫のウイルス病の主体はＮＰＶでありＧＶの感染率はＮＰＶに比べ非常に低かった[133]ことからP. unipunctaに対するＰｕＧＶＨの感染力は高くはないと思われる。また、ＴｎＧＶはアワヨトウ幼虫での増殖が困難（橋本、私信）であることから、アワヨトウに病原性を示さない、あるいは病原性がごく弱いものと思われる。このようにアワヨトウやシロモンヤガなどいくつかの宿主に対するＸｃＧＶの感染力はＰｕＧＶＨとＴｎＧＶに比較して非常に強いと思われるが、その強い感染力が後者２種ＧＶでは認められないＮＰＶ感染の干渉という現象で表れているものと考えられる。

ＰｕＧＶＨのＳＦに関しては、現在までに多数の報告がなされ、ＳＦのタンパク質としての特性解明も進んでいる。本研究では、ＳＦと対比しながらＸｃＧＶの感染力増強物質の特性調査や精製を行い、添加量に従って感染力増強活性が強まること、増強物質の熱安定性は比較的高いこと、ＳＦとほぼ同じ精製法で活性物質が単離できることを確認した。今回精製されたＸｃＧＶの感染力増強物質の分子量は、100kDaと報告されているＳＦ[156]よりも明らかに大きいが、これまでの実験の結果からはＳＦとＸｃＧＶの感染力増強物質の間には分子量以外の相違点は認められていない。

過去のＳＦに関する研究では原宿主であるP. unipunctaが、ＴｎＧＶでも生物検定の宿主はT. niが使われ、原宿主以外の昆虫に対する効果に関する報告は少ない。

Hukuhara et al.(1987)[58]は、P. unipuncta近縁種のアワヨトウではＳＦがＮＰＶ感染力を増強するが、カイコガとハスモンヨトウでは増強作用が認められなかったことを報告したが、感染力増強作用の宿主特異性に関する研究は他にはない。本研究では、ＸｃＧＶの宿主であるシロモンヤガ、ガンマキンウワバ、アワヨトウに加え、非宿主であるヨトウガ、タバコガにおいても感染力増強作用を確認しており、感染力増強物質の応用場面の広さを強調する結果を得ることができた。

ＰｕＧＶＨとＴｎＧＶは、分離宿主が異なり、分離地点もハワイ州[130]とルイジアナ州[49]と地理的に遠く離れているが、ＲＥＮパターンでは共通する切断片が多く[54]、また双方の宿主に交差感染することが知られている[20, 138]ことから、両者の近縁性は高いものと考えられる。遺伝子的には近縁と考えられるＴｎＧＶとＰｕＧＶＨではあるが、それぞれのＧＶの感染力増強作用を研究しているグループが作用のメカニズムに関して全く異なる説を主張していることは興味深い。Derksen & Granados(1988)[30]はＴｎＧＶ顆粒体のアルカリ可溶性タンパク質を経口接種した場合、囲食膜の崩壊が起こることを観察し、ＴｎＧＶの示すＮＰＶ感染増進の作用機構をＶＥＦが囲食膜を分解するためであると主張した。ＴｎＧＶのＶＥＦ遺伝子は塩基配列が決定された[54]ものの、作用そのものに関する解析は進んでいない。一方、Tanadaらのグループは感染力の増強はＳＦがウイルスと細胞の接着性を高めるためである[59, 134, 143, 144, 153, 155]と主張している。Kozuma & Hukuhara(1992)[73]は、ＳＦの構成成分の生化学的分析を続け、フォスファチジルコリンが作用活性に不可欠であることを報告し、Hukuhara & Zhu(1989)[59]は、電子顕微鏡と抗体を使った実験によりこの仮説を支持する結果を得ている。作用機構の解明には、ＧＶ間の感染力増強物質の比較検討を含め、さらに詳細な研究行う必要がある。近縁の２種であるＴｎＧＶとＰｕＧＶＨの他に、感染力増強作用を持つＧＶとして、遺伝的に異なるウイルスであるＸｃＧＶが発見されたことは、今後の作用機構解明や宿主とウイルスの相互作用解明に役立つものと期待される。

第Ⅳ編　　総合考察

近年、害虫防除は、化学合成農薬偏重からの脱却を求められている。化学合成農薬に代わる防除素材の開発は、オランダ、米国等いくつかの国で積極的に進められており、寄生蜂をはじめとする天敵昆虫の商品化並びに、ＢＴやバキュロウイルス等の昆虫病原微生物製剤の販売が行われている。国内でも消費者並びに生産者から安全性が高く環境への影響が少ない防除技術の実用化に期待が寄せられており、これに応え得る生物的防除技術開発が急がれる。

筆者は、1983年から寒地畑作害虫の生態に関する研究の一環として害虫の死亡原因調査を始めた。病原微生物が死亡要因として重要な役割を担っていることを明らかにし、防除技術開発の基礎となる昆虫病原微生物の探索とリスト作成を行い、13種の害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。特に、ヨーロッパでも重要害虫として知られているガンマキンウワバ等、ＧＶがこれまで未発見であった５種を含む８種の宿主から新たにＧＶを分離し、また、Entomophaga aulicae 等既知の病原微生物については新たな宿主を確認した。日本では、1950～70年代に病原微生物探索が集中して行われたが、その後は目立った報告がない。野外で罹病昆虫を発見する確率は低いが、本研究で実施した採集幼虫を室内個別飼育する方法により、新しい病原微生物を多数収集することが可能になると考えられる。死亡原因調査の結果、採集地点としては、定期的防除の行われている圃場よりも、害虫が数年間連続して発生し病原微生物の蓄積量が多いと考えられる草地などが適していることが示唆された。テンサイや蔬菜類の重要害虫数種からＧＶが分離され、死亡要因として重要な位置を占めることが明らかになったが、ＧＶは日本においては分離例が少なく、研究蓄積も非常に少ない。そこで、本研究では、ＧＶに重点を置き研究を進めることとした。

ＧＶは、一般に宿主域が狭いウイルスと見なされているが、各ＧＶの宿主域に関する研究は十分には行われていない。本研究で行った病原微生物探索では、異なる複数の宿主から、同時期に、狭い地域で、形態的に類似したＧＶが分離され、ウイルスの交差感染の可能性が示唆されたため、これらのＧＶの異同を明らかにする必要が生じた。ＮＰＶでは、ウイルスゲノムＤＮＡのＲＥＮパターンをもとにした同

定法が提唱され、遺伝的変異の検出や解析等、この方法の有用性を示す報告が増えている。そこで著者は、ＲＥＮ法の導入によって各宿主から分離したＧＶの同定を試みた。ＧＶの存在が確認された８種の宿主のうちシロモンヤガ、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を供試してＲＥＮパターンの比較を行ったところ、各ＧＶのパターンは若干の差異はあるものの非常に類似していた。さらに、シロモンヤガから分離されたＸｃＧＶαを代表に定めて切断片のクローニングを行い、それをプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った結果、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、ゲノムＤＮＡの制限酵素切断地図を作成し、ＸｃＧＶαと異種宿主分離ＧＶとの変異が認められる部分を特定した。これらの結果から、それぞれのＧＶは異なる宿主昆虫から分離されたにも関わらず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明らかになった。そこで、実験に供試した分離ＧＶを単一の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-migrum GV (XcGV)として取り扱うことにした。ＮＰＶでは、これまでにA. califronicaやT. ni等の異なる属の宿主から分離されたウイルスが同一ウイルスであることが確認された例が報告されているが、ＧＶでは異なる属の宿主から分離されたウイルスが同一種と確認された例は本研究が初めてである。また、室内飼育幼虫を供試した接種実験を行い、上記６種からの分離ＧＶはすべてシロモンヤガに感染性を持つこと、また、シロモンヤガ分離ＧＶが上記６種宿主のうち実験に供試した３種に感染することも確認した。ＲＥＮ解析と接種実験の結果から、ＸｃＧＶは、野外においても複数種の害虫に共通する病原ウイルスとして交差感染していることが示唆された。本研究では、異種宿主からの分離ＧＶの比較に加え、シロモンヤガから得られた個体別分離ＧＶ14例についても、ＲＥＮパターンの比較を行ったが、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った。従って、これらのＧＶゲノムの変異は、宿主の違いとは関係なく生じているものと考えられた。A. rapaeとその近縁種から分離されたＧＶやＣｐＧＶでは、異種宿主由来ＧＶ

や離れた地点から分離されたＧＶ間で遺伝的変異が報告されている。本研究で、各宿主から個体別に分離されたＸｃＧＶのＲＥＮパターンは、ごく狭い地域内で得られたウイルスでありながら、分離ＧＶ毎に小さな変異を示し、ウイルスの多様性や変異を考える上で非常に興味深い。これらの結果は、これまで分離宿主を基準に行われてきたＧＶの分類に基本的な改善を行う必要性を強く示している。今後は、ＧＶ間の近縁性を考える上でも、新規に分離されたＧＶのみならず、過去に報告されたＧＶについても、分子生物学的検討を詳細に行う必要があると思われる。

本研究では、制限酵素切断地図の零点の基準であるgranulin遺伝子の特定を行い、さらにその塩基配列を決定した。これまでに塩基配列が報告されたＧＶの遺伝子は、granulinとアポトーシス阻害遺伝子の２種類のみである。granulin遺伝子の塩基配列は、過去にＴｎＧＶとＰｂＧＶで報告があり、本研究が世界で３例目である。ＮＰＶのpolyhedrin遺伝子同様、ＧＶのgranulin遺伝子もウイルス間で相同性が高い遺伝子であることが予想されたが、ＴｎＧＶとＸｃＧＶの塩基配列の相同性は、90％と非常に高く、しかも、アミノ酸配列の差異は、１残基のみであった。ＴｎＧＶとＸｃＧＶは、ＲＥＮパターン、宿主域、感染力等様々な特性が異なることから別種のウイルスであることは明かであるが、双方ともヤガ科害虫を宿主とし、ゲノムサイズもほぼ同じであるなど両者の近縁性を示唆する共通の特性も認められており、granulin遺伝子のデータは、これを裏付けるものと言える。また、３種ＧＶにおけるgranulinのプロモーター領域の塩基配列は相同性が非常に高いことから、このタンパク質がＧＶにとって重要な機能を持つものと考えられる。

本研究では、上記の遺伝子解析に加え、ＸｃＧＶを主体に病理学的特性解明を行った。接種実験の結果、ＸｃＧＶは実験に供試した１４種のうち７種に感染することが明らかになった。宿主昆虫は、ヤガ科の少なくとも５亜種にまたがっており、ＸｃＧＶは、ＧＶとしては広い宿主域を持つと言える。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の病原性を比較したところ、特に若齢幼虫に対する病原性が高く、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かった。従って、シロモンヤガで十分な発病率が得られる量のＧＶを接種することにより、ガンマキンウワバでもシロモンヤ

ガと同様の殺虫効果が期待できるものと考えられるが、アワヨトウでは十分な効果が得られないものと思われる。シロモンヤガとガンマキンウワバでは、ＧＶが野外における死亡原因として主要な位置を占めており、顆粒病の流行も観察されていることから、これら２種宿主に対してＸｃＧＶが高い感染力を持つことが期待されたが、接種実験の結果はこの推測と一致するものであった。

本研究では、ＸｃＧＶ接種後のシロモンヤガ幼虫の外観や生長の変化等、感染経過の詳しい観察を行った。その結果、２、３齢期にＧＶを接種した場合は、５齢期以降に病徴が明らかになること、大半の個体は６齢まで生存して健全虫を越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なった。ＧＶ感染個体が長期間生存し、健全個体よりも大きくなる現象はＰｕＧＶＨやＴｎＧＶなどいくつかのＧＶで報告されているが、ウイルスによる幼虫の過剰脱皮はこれまで知られていない。ＮＰＶは脱皮ホルモンの代謝関連酵素遺伝子の発現によって感染幼虫の脱皮を阻害することが知られているが、ＧＶは幼虫期間の延長や過剰脱皮等、ＮＰＶとは異なる様式で宿主の生長や変態に関わる物質の制御を行っていると考えられる。

また、感染との関連は明らかではないが、顆粒体懸濁液を塗布した食草、または懸濁液を練り混ぜた人工飼料を若齢幼虫に与えた場合、特に非宿主昆虫で生育が著しく阻害されることが明らかになった。ヨトウガ、ハスモンヨトウ、アワヨトウで比較するとＧＶの非宿主である前２種では、人工飼料に加えた顆粒体量の増加に従って死亡率が高くなり、死亡した幼虫では摂食並びに生育は認められなかった。他方、ＧＶに感受性を持つアワヨトウでは、生育の遅延は認められたものの生育阻害の程度が最も弱かった。これらの現象が起こる機構は不明であるが、幼虫はごく少量の餌の摂取により摂食阻害作用あるいは強い忌避作用を受けるものと考えられる。防除対象害虫の範囲拡大並びに環境への影響評価の双方の観点から、ＧＶが宿主以外の生物に及ぼす影響を調査し、何らかの作用が認められた場合はその機構を明らかにしていく必要があるものと思われる。

過去に分離されたＧＶのうち、詳細な研究が行われたＧＶは、ＴｎＧＶ、ＣｐＧＶ、ＰｂＧＶ、ＰｕＧＶＨ等ごく少数に過ぎない。著者は、ＰｕＧＶＨで発見され

たＮＰＶ感染力の増強作用に強い関心を持ち、北海道で多数分離されたＧＶにも同様の作用を持つものがあるのではないかと考え、ＮＰＶとＧＶの混合感染実験を行った。まず、シロモンヤガ５齢幼虫で接種実験を行い、ＸｃＧＶの添加により明らかにＮＰＶの感染率が上昇することを発見した。次に、ＧＶの顆粒体、あるいは顆粒体のアルカリ可溶性画分をＮＰＶと共に各種害虫に経口接種した。その結果、ＸｃＧＶのＮＰＶ感染力増強作用の活性は顆粒体のアルカリ可溶性画分に存在すること、ＧＶ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、ＧＶに感受性を示さないヨトウガ、タバコガでもＮＰＶ感染力の増強が起こること、また、増強作用は複数のＮＰＶに対して認められることを確認した。本研究を開始した後、ＰｕＧＶＨに加えＴｎＧＶでも感染力増強作用が確認され報告されたが、双方ともＧＶの分離宿主を供試して実験を行っており、ＧＶの非宿主を含む複数の種で感染力増強が確認されたのは、本研究が初めてである。ＰｕＧＶＨとＴｎＧＶでは、顆粒体の添加量を増加することによりＮＰＶ感染力増強作用が強化されることが報告されているが、シロモンヤガ、アワヨトウ並びにガンマキンウワバを用いた場合、ＸｃＧＶ顆粒体の量を増加すると、ＧＶのみによる感染が優先し、ＮＰＶの感染が干渉される場合があることが確認され、この干渉作用は若齢で顕著であった。この現象は、ＸｃＧＶの強い感染力によって、ＮＰＶ感染増強作用がマスクされた結果生じたものと考えられ、感染力増強作用を効率的に利用するためには、ＧＶ顆粒体から活性成分を分離する必要があることが示唆された。ＰｕＧＶＨの感染力増強物質に関しては、現在までに多数の報告がなされ、タンパク質としての特性解明も進んでいる。本研究では、これらを参考にＸｃＧＶの感染力増強物質の特性調査や精製を行い、添加量に従って感染力増強活性が強まること、増強物質の熱安定性は比較的高いこと、ＰｕＧＶＨとほぼ同じ精製法で活性物質が単離できることを確認した。ＸｃＧＶの感染力増強物質の分子量は、100kDaと報告されているＰｕＧＶＨの増強物質よりも数kDa大きいが、これまでの実験の結果からは、分子量以外には両者の間に明らかな相違は認められていない。ＰｕＧＶＨの近縁のウイルスであるＴｎＧＶに加え、遺伝的に異なるＧＶであるＸｃＧＶが感染力増強作用を持つＧＶとして発見されたことは、今後の作用機構解明や、ウイルスと宿主の相互作用解明

に大いに役立つものと期待される。

著者は、本研究で、複数の害虫から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を行い、それらが同一ウイルスであることを明らかにした。このうちシロモンヤガからの分離ＧＶを用いて、遺伝子解析の基礎となる、ゲノムＤＮＡのクローニングとgranulin遺伝子の特定並びに塩基配列の決定を併せて行った。また、感染特性の解明を行い、シロモンヤガＧＶがＮＰＶ感染力増強作用を持つことを明らかにし、その活性成分の分離精製と性状の解析を行った。シロモンヤガＧＶは、ＧＶとしては広い宿主域を持ち、感染力が強いことから、致死に長期間を要するという問題はあるが、害虫防除に活用し得る有望な素材であると考えられる。また、シロモンヤガＧＶのＮＰＶ感染力増強物質は、ＮＰＶの害虫防除効果を向上させる添加剤として利用が期待される。本研究の成果が、生物的防除技術の開発の一助となれば幸いである。

第Ⅴ編　英文総括

Pathology and Molecular Biology of Granulosis Viruses Isolated from Several Noctuid Pests

Chie Goto

Summary

There has been increasing concern regarding the safety of food crops and the hazardous effects of chemical pesticides on the environment. In the search for alternatives to chemical insecticides, the use of insect pathogens as biological control agents is being investigated. However, there is little information on the natural incidence of insect disease, especially in Hokkaido. This study was undertaken to isolate natural pathogens of insect pests and to characterize them for evaluation as potential control agents.

1. Investigation of mortality-producing agents of insect pests of upland crops and isolation of insect pathogenic viruses

The 13 species of insect pests, mostly armyworm larvae, were collected from the field in Tokachi in Hokkaido and individually reared in the laboratory. The larvae and pupae which died in the course of rearing were microscopically examined and the causative agents were identified. Viruses and fungi, such as GVs, NPVs, CPVs, Entomophaga aulicae, and Paecilomyces spp., were commonly isolated from many species. Epizootics of E. aulicae were recognized in 5 noctuid species and one species of Pieridae in alfal-

fa fields. Xestia c-nigrum, Mythimna separata, Autographa gamma, Hydraecia amurensis, Celaena leucostigma, Aletia pallens, and Mesapamea concinnata were identified as hosts of GVs. These species exept for X. c-nigrum, and Mythimna separata have not been reported as hosts of GV previously. GV and NPV seemed to play an important role in the control of X. c-nigrum, as GV and CPV in Autographa gamma. There seemed to be the cross-transmission of GVs among noctuid species.

2. Restriction endonuclease analysis and mapping of the genomes of GVs isolated from several noctuid species and granulin gene sequence analysis

Restriction endonuclease (REN) analysis was performed on the genomic DNA of granulosis viruses isolated from X. c-nigrum, A. gamma, H. amurensis, C. leucostigma, Aletia pallens, and M. separata. All of the isolates gave very similar REN profiles with only minor variations. An isolate obtained from X. c-nigrum was chosen as the reference genotype, and a genomic library was constructed for this isolate using plasmid vectors. The genome was mapped using Eco R I, Bam H I and Bgl II, and Southern hybridization; the size of the genome was estimated to be 179 kbp. Hybridization of labeled clones to fragments of other isolates revealed that genotypic variation among isolates resulted from changes in restriction sites, and from deletion or insertion of DNA. Comparative restriction mapping revealed that all of the isolates were variants of one virus, even though they originated from different host species.

The plasmids containing the coding region and the 5' and 3' flanking regions of XcGV granulin gene were subcloned and sequenced. The nucleotide sequence data were compared to those for the granulin gene from GVs isolated from Pieris brassicae and Trichoplusia ni (TnGV). The amino acid sequences derived from these DNA sequences indicated that the two GV pro-

teins of XcGV and TnGV are almost the same with one amino acid difference among 248 of them. The 5' flanking region of all of these genes contains a highly conserved sequence of 14 nucleotides (TTTATAAGGAATTT), including one of the consensus sequences of the baculovirus late gene promoters.

3. Morphology and Pathogenicity of the GV isolated from X. c-nigrum

The capsules of XcGV were ovocylindrical and ranged in length from 0.45 to 0.61 μm with a mean of 0.50 μm, and in width from 0.23 to 0.29 μm with a mean of 0.26 μm. Alkaline-liberated virions were rod-shaped and measured 405 $\pm$ 17 $\times$ 69 $\pm$ 8 nm. Bioassay and REN analysis revealed that XcGV was infective for at least 7 noctuid species among 14 tested. Larvae of X. c-nigrum, infected with XcGV even in earlier instars, continued to grow; indeed half of them moulted to extra instars and died in a size of larger than the normal larvae prior to pupation.

Feeding on diets containing a large amount of capsules of XcGV caused inhibition of growth and a rapid mortality in 2-3 days, in neonate larvae of Mamestra brassicae and Spodoptera litura, not susceptible to XcGV. Though this phenomenon was not obvious in species susceptible to XcGV.

4. Characterization of the enhancing effect of XcGV on NPV infection and isolation of the enhancing factor from capsules

Interactions between XcGV and NPVs, isolated from X. c-nigrum (trigonal and tetragonal strains), M. brassicae (Tokyo strain), and Mythimna separata were examined. The diet was contaminated with polyhedra of each of the NPVs and capsules, or polyhedra and the supernatant of alkaline-dissolved capsules (GV-sup), and was fed to larvae susceptible for XcGV, such as X. c-nigrum, M. sepatata, and A. gamma, or to those not susceptible for XcGV such as Mamestra brassicae and Helicoverpa assulta. Addition

of GV-sup enhanced infection of NPVs in all of these species, and the percentage of NPV infected larvae increased as GV-sup content increased. Although addition of capsules enhanced NPV infection, larger quantities of capsules increased the ratio of larvae exclusively infected with GV in the species susceptible to XcGV. In this case, XcGV seemed to suppress the enhancing effect and even interfered with the NPV infection. The enhancing effect of GV on infection with NPVs is known in Pseudaletia unipuncta GV (PuGVH) and TnGV, but there have been no reports of interference in NPV infections by these GVs. It seemed that interference in NPV infection did not occur, because of the low infectivity of these two GVs.

A factor that enhances the NPV infection in noctuid larvae was isolated from the capsules of XcGV by gel filtration on a Sephacryl S-300 column and by DEAE-cellulose column chromatography. This purification resulted in a homogeneous product as indicated by SDS-PAGE. The molecular weight of the enhancing factor, as determined by the SDS-PAGE method, was about 108 kDa, larger than that of PuGVH.

第VI編　参考文献

1. Ackermann, H. -W. and W.A. Smirnoff. 1983. A morphological investigation of 23 Baculoviruses. J. Invertebr. Pathol. 41: 269-280.
2. Aizawa, K. and Y. Nakazato. 1963. Diagnosis of diseases in insects: 1959-1962. Mushi. 37: 155-158.
3. Akiyoshi, D., R. Chakerian, G. F. Rohrmann, M. H. Nesson, and G.S. Beaudreau. 1985. Cloning and sequencing of the granulin gene from the Trichoplusia ni granulosis virus. Virology 141: 328-332.
4. 阿久津喜作. 1971. 顆粒病ウイルスによるモンシロチョウ幼虫の防除. 応動昆 15: 56-62.
5. 阿久津喜作. 1972. 天敵ウイルスによる野菜害虫の防除. 植物防疫. 26 : 19-23.
6. 阿久津喜作, 永沢 実. 1971. Entomophthora grylliによるヨトウガの流行病について. 関東東山病虫研報 18: 101.
7. Allaway, G. P. and C. C. Payne. 1984. Host range and virulence of five baculoviruses from lepidopterous hosts. Ann. appl. Biol. 105: 29-37.
8. 青木襄児. 1989. 昆虫病原菌の検索. pp280. 全国農村教育協会. 東京.
9. Arif, B. M., Z. Guangyu, and P. Jamieson. 1986. A comparison of three granulosis viruses isolated from Choristoneura spp. J. Invertebr. Pathol. 48: 180-186.
10. 浅山 哲. 1982. 鱗翅目昆虫Baculovirusの感染ならびに形態形成に関する研究. 愛知県農業総合試験場特別報告. 第３号. pp85.
11. Bergold, G. H. 1948. Uber die kapselvirus-krankheit. Z. Naturforsch. 3b. 338-342.
12. Bird, F. T. 1959. Polyhedrosis and granulosis viruses causing single and double infections in the spruce budworm, Choristoneura fumiferana Clemens. J. Insect Pathol. 1: 406-430.

13. Birnstiel, M. L., M. Busslinger, and K. Strub. 1985. Transcription termination and 3'processing: The end is in site! Cell. 41: 349-359.

14. Bliss, C. I. 1934. The method of probits - A correction. Science 79: 409-410.

15. Blissard, G. W. and G. F. Rohrmann. 1990. Baculovirus diversity and molecular biology. Annual Review of Entomol. 35: 127-155.

16. Brown, S. E., J. E. Maruniak, and D. L. Knudson. 1985. Baculovirus (MNPV) genomic variants: Characterization of Spodoptera exempta MNPV DNAs and comparison with other Autographa californica MNPV DNAs. J. Gen. Virol. 66: 2431-2441.

17. Burgess, S. 1983. EcoR I restriction endonuclease fragment patterns of eight lepidopteran baculoviruses. J. Invertebr. Pathol. 42: 401-404.

18. Cattano, S. P. and W. H. R. Langridge. 1982. Characterization of DNA from a granulosis virus of Estigmene acrea: (Lepidoptera). Virology. 119: 199-203.

19. Chakerian, R., G.F. Rohrmann, M.H. Nesson, D. J. Leisy, and G.S. Beaudreau. 1985. The nucleotide sequence of the Pieris brassicae granulosis virus granulin gene. J. Gen. Virol. 66: 1263-1269.

20. Chang, P. and Y. Tanada. 1978. Serological study on the transmission of a granulosis virus of the armyworm, Pseudaletia unipuncta (Lepidoptera: Noctuidae), to other lepidopterous species. J. Invertebr. Pathol. 31: 106-117.

21. Consigli, R. A., D. L. Russell, and M. E. Wilson. 1986. The biochemistry and molecular biology of the granulosis virus that infects Plodia interpunctella. Current Topics in Microbiolgry and Immunology. 131: 69-101.

22. Crook, N.E. 1981. A comparison of the granulosis viruses from Pieris brassicae and Pieris rapae. Virolgy. 115: 173-181.

23. Crook, N. E. 1986. Restriction enzyme analysis of granulosis virus isolated from Artogeia rapae and Pieris brassicae. J. Gen. Virol. 67: 781-787.

24. Crook, N. E. 1991. Baculoviridae: Subgroup B: Comparative aspects of granulosis viruses. p. 73-110. E. Kurstak (ed). Viruses of Invertebrates. Marcel Dekker, INC. New York.

25. Crook, N. E., J. D. Brown, and G. N. Foster. 1982. Isolation and characterization of a granulosis virus from the tomato moth, Lacanobia oleracea, and its potential as a control agent. J. Invertebr. Pathol. 40: 221-227.

26. Crook, N. E., R. J. Clem, and L. K. Miller. 1993. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. J. Virol. 67 : 2168-2174.

27. Crook, N. E., R. A. Spencer, C. C. Payne, and D. J. Leisy. 1985. Variation in Cydia pomonella granulosis virus isolates and physical maps of the DNA from three variants. J. Gen. Virol. 66: 2423-2430.

28. Cunningham, J. C. 1968. Serological and morphological identification of some nuclear-polyhedrosis and granulosis viruses. J. Invertebr. Pathol. 11: 132-141.

29. David. W. A. L. 1975. The status of viruses pathogenic for insects and mites. Ann. Rev. Entomol. 20: 97-117.

30. Derksen, A. C. G. and R. R. Granados. 1988. Alteration of a lepidopteran peritrophic menbrane by baculoviruses and enhancement of viral infectivity. Virology. 167: 242-250.

31. Doane, C. C. 1970. Primary pathogens and their role in the development of an epizootic in the gypsy moth. J. Invertebr. Pathol. 15: 21-33.

32. Dwyer, K. G. and R. R. Granados. 1987. A physical map of the Pieris rapae granulosis virus genome. J. Gen. Virol. 68: 1471-1476.

33. Easwaramoorthy, S. and J. S. Cory. 1990. Characterization of the DNA of granulosis viruses isolated from two closely related moths, Chilo infuscatellus and C. saccariphagus indicus. Arch. of Virol. 110: 113-119.

34. Ehler, L. E. 1977. Natural enemies of cabbage looper on cotton in the San Joaquin Valley. Hilgardia, 45: 73- 106.

35. Erlandson, M. A. 1990. Biological and biochemical comparison of Mamestra configurata and Mamestra brassicae nuclear polyhedrosis virus isolates pathogenic for the bertha armyworm Mamestra configurata (Lepidoptera: Noctuidae). J. Invertebr. Pathol. 56: 47-56.

36. Federici, B. A. 1978. Baculovirus epizootic in a larval population of the clover cutworm, Scotogramma trifolii, in southern California. Environ. Entomol. 7: 423-427.

37. Francki, R. I. B., C. M. Fauquet, D. L. Knudson, and F. Brown. 1991. Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international committee on taxonomy of viruses. pp. 450. Springer-Verlag. Wien and New York.

38. 藤村俊彦. 1976. シロモンヤガの越冬生態. 北海道農試研報. 113: 87-93.

39. Gallo, L. G., B. G. Corsaro, P. R. Hughes, and R. R. Granados. 1991. In vivo enhancement of baculovirus infection by the viral enhancing factor of a granulosis virus of the cabbage looper, Trichoplusia ni (Lepidoptera: Noctuidae). J. Invertebr. Pathol. 58: 203-210.

40. Getting R. R. and W. J. McCarthy. 1982. Genotypic variation among wild isolates of Heliothis spp nuclear polyhedrosis viruses from different geographical regions. Virology 117: 245-252.

41. Goto, C. 1990. Enhancement of a nuclear polyhedrosis virus (NPV) infection by a granulosis virus (GV) isolated from the spotted cutworm, Xestia c-nigrum L. (Lepidoptera: Noctuidae). Appl. Ent. Zool. 25: 135-137.

42. Goto, C., Y. Minobe, and T. Iizuka. 1992. Restriction endonuclease analysis and mapping of the genomes of granulosis viruses isolated from Xestia c-nigrum and five other noctuid species. J. Gen. Virol. 73: 1491-1497.

43. 後藤千枝，筒井　等. 1988. アルファルファの鱗翅目害虫で観察された疫病菌の流行. 応動昆. 33: 35-38.

44. 後藤千枝，筒井　等. 1991. シロモンヤガ. p. 219-220. 湯島　健，釜野静也，玉木佳男編. 昆虫の飼育法. 400pp. 日本植物防疫協会. 東京.

45. 後藤千枝，筒井　等，本間健平，飯塚敏彦，中島敏夫. 1985. シロモンヤガの核多角体病ウイルスおよび顆粒病ウイルスとその形態. 応動昆. 29: 102-106.

46. Granados, R. R. 1980. Infectivity and mode of action of baculoviruses. Biothechnol. Bioeng. 22: 1377-1405.

47. Granados, R. R., A. C. G. Derksen, and K. G. Dwyer. 1986. Replication of the Trichoplusia ni granulosis and nuclear polyhedrosis viruses in cell cultures. Virology 152: 472-476.

48. Hamm, J. J. 1980. Epizootics of Entomophthora aulicae in Lepidopterous pests of sorgum. J. Invertebr. Pathol. 36: 60-63.

49. Hamm, J. J. and J. D. Paschke. 1963. On the pathology of a granulosis of the cabbage looper, Trichoplusia ni (Hubner). J. Insect Pathol. 5: 187-197.

50. Hara, S., Y. Tanada, and E. M. Omi. 1976. Isolation and characterization of a synergistic enzyme from the capsule of a granulosis virus of the armyworm, Pseudaletia unipuncta. J. Invertebr. Pathol. 27: 115-124.

51. Harrap, K. A. 1972. The structure of nuclear polyhedrosis viruses. 1. The inclusion body. Virology 50: 114-123.

52. Harvey, J. and Y. Tanada. 1985. Characterization of the DNAs of five baculoviruses pathogenic for the armyworm, Pseudaletia unipuncta. J. Invertebr. Pathol. 46: 174-179.

53. Harvey, J. P. and L. E. Volkman. 1983. Biochemical and biological variation of Cydia pomonella (Codling moth) granulosis virus. Virology. 124: 21-34.

54. Hashimoto, Y., B. G. Corsaro, and R. R. Granados. 1991. Location and nucleotide sequence of the gene encoding the viral enhancing factor of the Trichoplusia ni granulosis virus. J. Gen. Virol. 72: 2645-2651.

55. Hofmaster, R. N. 1961. Seasonal abundance of the cabbage looper as related to light trap collections, precipitation, temperature and the incidence of a nuclear polyhedrosis virus. J. Econ. Ent. 54:796-798.

56. Hooft van Iddekinge, B. J. L., G. E. Smith, and M. D. Summers. 1983. Nucleotide sequence of the polyhedrin gene of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. Virology, 131: 561-565.

57. 福原敏彦，阿久津喜作，渡部　仁．1966．日本産昆虫のウイルス病について．植物防疫．20: 543-546.

58. Hukuhara, T., K. Tamura, Y. Zhu, H. Abe, and Y. Tanada. 1987. Synergistic factor shows specificity in enhancing nuclear polyhedrosis virus infections. Appl. Ent. Zool. 22: 235-236.

59. Hukuhara, T. and Y. Zhu. 1989. Enhancement of the in vitro infectivity of a nuclear polyhedrosis virus by a factor in the capsule of a granulosis virus. J. Invertebr. Pathol. 54: 71-78.

60. Ignoffo, C. M. 1968. Specificity of insect viruses. Bull. Entomol. Soc. Amer. 14: 265-276.

61. Ignoffo, C. M. 1981. The fungus Nomuraea rileyi as a microbial insecticide. p. 513-538. H. D. Burges (ed.). Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. Academic Press. London.

62. Ignoffo, C. M. and T. L. Couch. 1981. The nucleopolyhedrosis virus of Heliothis species as a microbial insecticide. p. 329-362. H. D. Burges (ed.). Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. Academic Press. London.

63. Ignoffo, C. M., B. S. Shasha, and M. Shapiro. 1991. Sunlight ultraviolet protection of the Heliothis nuclear polyhedrosis virus through starch-encapsulation technology. J. Invertebr. Pathol. 57: 134-136.

64. Iizuka, T., S. Aoki, and C. Goto. 1987. Identification of two nuclear polyhedrosis virus from the spotted cut-worm, Xestia c-nigrum (Lepidoptera, Noctuidae). J. Fac. Agr. Hokkaido Univ. 63. Pt. 1: 104-113.

65. Jehle, J. A., Backhaus, H., E. Fritshe, and J.Huber. 1992. Physical map of the Cryptophlebia leucotreta granulosis virus genome and its relationship to the genome of Cydia pomonella granulosis virus. J. Gen. Virol. 73: 1621-1626.

66. Katagiri, K. 1969. Review on microbial control of insect pests in forests in Japan. Entomophaga 14: 203-214.

67. 河上　清. 1990. 天敵糸状菌による害虫防除研究の現状. p.250-262. 梅谷献二, 加藤　肇編. 農業有用微生物その利用と展望. 総合農業研究叢書 18: 農業研究センター.

68. 河原畑　勇. 1963. モンシロチョウgranulosis virusの幼虫齢別感受性について. 第７回応用動物昆虫学会大会講演要旨集. p44.

69. Kelly, D. C. and D. A. Brown. 1980. Biochemical and biophysical properties of a Mamestra brassicae multiple enveloped nuclear polyhedrosis virus. Aech. Virol. 66: 133-141.

70. 菊田治典. 1989 . 北海道の土壌から分離された Bacillus thuringiensis －喜茂別町、蘭越町、ニセコ町からの分離株－. 北大農邦文紀要 16: 383-389.

71. 北島鉞雄. 1938. モンシロテウ(Pieris rapae crucivora Boisd.) 幼虫の脂肪病に就て. 鹿児島高農学報. 13: 111-118.

72. 小泊重洋. 1980. チャのハマキムシ類に対する顆粒病ウイルスの利用. 植物防疫. 34: 462-466.

73. Kozuma, k. and T. Hukuhara. 1992. A synergistic factor of an armyworm granulosis virus contains phosphatidylcholine. J. Invertebr. Pathol. 59: 328-329.

74. 国見裕久. 1986. クワゴマダラヒトリ核多角体病の病理生態学的研究. 東京蚕指研報 2 : 1-93.

75. 国見裕久. 1990. 微生物の利用による害虫防除の現状と展望. 植物防疫. 44 : 377-382.

76. 国見裕久. 1993. 日本産昆虫の天敵微生物目録. 192-222. 岡田斉夫ら編. 天敵微生物の研究手法. 植物防疫特別増刊 2. 日本植物防疫協会. 東京.

77. 楠野正夫. 1966. アメリカシロヒトリの生物的防除に関する研究. 東京蚕指研報 1 : 1-41.

78. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bactriophage T4. Nature (London) 227: 680-685.

79. Leisy, D. J., G. F. Rohrmann, and G. S. Beaudreau. 1984. Consevation of genome organization in two multicapsid nuclear polyhedrosis viruses. J. Virol. 52: 699-702.

80. Lepine, P., C. Vago, and O. Croissant. 1953. Mise en evidence au microscope electronique du virus de la polyedrie de Plusia gamma L. (Lepidoptera) Annales de l'Institut Pasteur. 85: 170-173.

81. Lowe, R. E. and J. D. Paschke. 1968. Simultaneous infection with the nucleopolyhedrosis and granulosis viruses of Trichoplusia ni. J. Invertebr. Pathol. 12: 86-92.

82. Lowe, R. E. and J. D. Paschke. 1968. Pathology of a double viral infection of Trichoplusia ni. J. Invertebr. Pathol. 12: 438-443.

83. Martignoni, M. E. and P. J. Iwai. 1981. A catalogue of viral diseases of insects, mites, and ticks. p897-911. H. D. Burges (ed.) Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. Academic Press. London.

84. Maruniak, J. E. and M. D. Summers. 1987. Comparative peptide mapping of baculovirus polyhedrins. J. Invertebr. Pathol. 32: 196-201.

85. McIntosh, A. H. and C. M. Ignoffo. 1983. Restriction endonuclease patterns of three baculoviruses isolated from species of Heriothis. J. Invertebr. Pathol. 41: 27-32.

86. Miller, L. K. and K. P. Dawes. 1978. Restriction endonuclease analysis for the identification of baculovirus pesticides. Appl. Envirion. Microbiol. 35: 411-421.

87. Moscardi, F. 1989. Use of viruses for pest control in Brazil: the case of the nuclear polyhedrosis virus of the soybean caterpillar, Anticarsia gemmatalis. Memorias do Institute Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 84: supl. Ⅲ 51-56.

88. National Academy of Science. 1969. Insect-pest management and cotrol. Vol. 3. Principles of plant and animal pest control. Natl. Acad. Sci. Pub. 1695, 508 pp.

89. 根本　久. 1975. 第１９回応動昆講演要旨. p54.

90. Ohba, M. and Y. Tanada. 1983. A synergistic factor enhances the in vitro infection of an insect baculovirus. Naturwissenshaften 70, S. 613.

91. Ohba, M. and Y. Tanada. 1984. In vitro enhancement of nuclear polyhedrosis virus infection by the synergistic factor of a granulosis virus of the armyworm, Pseudaletia unipuncta (Lepidoptera, Noctuidae). Ann. Virol. (Inst. Pasteur) 135 E: 167-176.

92. Ohba, M. and Y. Tanada. 1984. A synergistic factor of an insect granulosis virus agglutinates insect cells. Experientia 40: 742-744.

93. 岡田斉夫. 1977. 核多角体病ウイルスによるハスモンヨトウの防除に関する研究. 中国農試報 E12: 1-66.

94. 岡田斉夫. 1990. 天敵ウイルスによる害虫防除研究の現状. p278-293. 梅谷献二, 加藤　肇　編. 農業有用微生物. 総合農業叢書 18. 農業研究センター.

95. 奥　俊夫, 小林　尚. 1974. 東北地方の畑地におけるヨトウガの密度変動 VI 老齢幼虫および蛹の死亡原因. 東北農試研報 47: 165-179.

96. 奥山七郎, 梶野洋一, 佐藤　謙. 1988. 北海道における1987年のアワヨトウの異常発生 1. 第１世代広域大発生の経過とその原因. 北日本病虫研報. 39: 9-12.

97. 奥山七郎, 梶野洋一, 佐藤　謙, 秋山安義, 橋本庸三. 1988. 北海道における1987年のアワヨトウの異常発生 2. 第２世代の発生経過とその原因. 北日本病虫研報 39: 13-17.

98. O'Reilly, D. R. and L. K. Miller. 1989. A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase. Science 245: 1110-1112.

99. O'Reilly, D. R. and L. K. Miller. 1990. Regulation of expression of a baculovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene. J. Virol. 64: 1321-1328.

100. Orlob, G. B., D. Seto, and A. Sun. 1973. Effects of granulosis virus on aphids. J. Invertebr. Pathol. 22: 220-227.

101. Paillot, A. 1926. Sur une nouvelle maladie du noyau au grasserie des chemilles de P. brassicae et un nouveau groupe de micro-organismes parasites. C. R. Acad. Sci. 182. 180-182.

102. Payne, C. C. and D. C. Kelly. 1981. Identification of insect and mite viruses. p62-91. H. D. Burges (ed.). Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. Academic Press. London.

103. Pritchett, D. W., S. Y. Young, and W. C. Yearian. 1982. Dissolution of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus polyhedra by the digestive fluid of Trichoplusia ni (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. J. Invertebr. Pathol. 39: 354-361.

104. Pritchett, D. W., S. Y. Young, and W. C. Yearian. 1984. Some factors involved in the dissolution of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus polyhedra by digestive fluids of Trichoplusia ni larvae. J. Invertebr. Pathol. 43: 160-168.

105. Qiu,B., M. Pei, X. Ai, Y. Shi, and Z. Wu. 1986. The genomic libraries and physical map of Agrotis segetum granulosis virus. Acta Microbiol. Sinica 26: 210-215.

106. Rohrmann, G. F. 1986. Polyhedrin structure. J. Gen. Virol. 67: 1499-1513.

107. Rohrmann, G. F. 1992. Baculovirus structural proteins. J. Gen. Virol. 73: 749-761.

108. 斉藤　修，後藤千枝．1992．てん菜圃場におけるヨトウガとシロモンヤガの天敵ウイルスによる防除試験．北日本病虫研報　43: 189-190.

109. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

110. Sato, T., N. Oho, and S. Kodomari. 1986. Utilization of granulosis viruses for controlling leafrollers in tea fields. JARQ 19: 271-275.

111. 清野昭夫．1981．ガマキンウワバの分布について．誘蛾灯．85: 111-116.

112. Shapiro, D. I., J. R. Fuxa, H. D. Braymer, and D. P. Pashley. 1991. DNA restriction polymorphism in wild isolates of Spodoptera frugiperda nuclear polyhedrosis virus. J. Invertebr. Pathol. 58: 96-105.

113. Shapiro, M. and R. A. Bell. 1982. Enhanced effectiveness of Lymantria dispar (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus formulated with boric acid. Ann. Entomol. Soc. Am. 75: 346-349.

114. Shapiro, M. and J. L. Robertson. 1990. Laboratory evaluation of dyes as ultraviolet screens for the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. J. Econ. Entmol. 83: 168-172.

115. 志賀正和，中沢　斎．1980．リンゴコカクモンハマキの顆粒病ウイルスによる防除．植物防疫．34: 467-471.

116. Smith, G. E. and M. D. Summers. 1978. Analysis of baculovirus genomes with restriction endonucleases. Virology 89: 517-527.

117. Smith, G. E. and M. D. Summers. 1979. Restriction maps of five Autographa californica MNPV variants, Trichoplusia ni MNPV, and Galleria mellonella MNPV DNAs with endonucleases Sma I, Kpn I, BamHI, Sac I, Xho I, and EcoR I. J. Virol. 30: 828-838.

118. Smith, G. E. and M. D. Summers. 1981. Application of a novel radio-immunoassay to identify baculovirus structural proteins that share interspecies antigenic determinants. J. Virol. 39: 125-137.

119. Smith, G. E. and M. D. Summers. 1982. DNA homology among subgroup A, B, and C baculoviruses. Virology 123: 393-406.

120. Smith, I. R. L. and N. E. Crook. 1988. Physical maps of the genomes of four variants of Artogeia rapae granulosis virus. J. Gen. Virol. 69: 1741-1747.

121. Smith, I. R. L. and N. E. Crook. 1988. In Vivo isolarion of baculovirus genotypes. Virology 166: 240-244.

122. Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-517.

123. Steinhaus, E. A. 1947. A new disease of the variegated cutworm, Peridroma margaritosa (Haw.). Science 106: 323.

124. Steinhaus, E. A. 1949. Principles of Insect Pathology. pp757. Macgraw-Hill, New York.

125. Summers, M. D. 1977. Baculoviruses (Baculoviridae). 3-27. K. Maramorsh (ed.). The atlas of insect and plant viruses. Academic Press, New York and London.

126. Summers, M. D. and P. Hoops. 1980. Radioimmunoassay analysis of baculovirus granulins and polyhedrins. Virology 103: 89-98.

127. Summers, M. D. and G. E. Smith . 1978. Baculovirus structural poly-peptides. Virology 84: 390-402.

128. 高木一夫. 1991. 生物学的防除技術交流団. p146-152. 日中農林水産科学技術交流10年の歩み. 日中農業技術交流グループ10周年記念事業実行委員会編. 亜細亜農業技術交流協会. 東京.

129. Tanada, Y. 1953. Description and characteristic of a granulosis virus of the imported cabbageworm. Proc. Hawaii. Ent. Soc. 15: 235-260.

130. Tanada, Y. 1956. Some factors affecting the susceptibility of the armyworm to virus infection. J. Econ. Entomol. 49: 52-57.

131. Tanada, Y. 1959. Discriptions and characteristics of a nuclear polyhedrosis virus and a granulosis virus of the armyworm, Pseudaletia unipuncta (Haworth) (Lepidoptera, Noctuidae). J. Insect Pathol. 1: 197-214.

132. Tanada, Y. 1959. Synergism between two viruses of the armyworm, Pseudaletia unipuncta (Haworth) (Lepidoptera, Noctuidae). J. Insect Pathol. 1: 215-231.

133. Tanada, Y. 1961. The epizootiology of virus diseases in field populations of the armyworm, Pseudaletia unipuncta (Haworth). J. Insect Pathol. 3: 310-323.

134. Tanada, Y., R. T. Hess, and E. M. Omi. 1975. Invasion of a nuclear polyhedrisis virus in midgut of the armyworm, Pseudaletia unipuncta, and the enhancement of a synersistic enzyme. J. Invertebr. Pathol. 26 : 99-104.

135. Tanada, Y., M. Himeno, and E. M. Omi. 1973. Isolation of a factor, from the capsule of a granulosis virus, synergistic for a nuclcear-polyhedrosis virus of the armyworm. J. Invertebr. Pathol. 21: 31-40.

136. Tanada, Y. and T. Hukuhara. 1968. A nonsynergistic strain of a granulosis virus of the armyworm, Pseudaletia unipuncta. J. Invertebr. Pathol. 12: 263-268.

137. Tanada, Y. and T. Hukuhara. 1971. Enhanced infection of a nuclear-polyhedrosis virus in larvae of the armyworm, Pseudaletia unipuncta, by a factor in the capsule of a granulosis virus. J. Invertebr. Pathol. 17: 116-126.

138. Tanada, Y. and E. M. Omi. 1974. Persistence of insect viruses in field populations of alfalfa insects. J. Invertebr. Pathol. 23: 360-365.

139. Tuan, S. and R. F. Hou. 1988. Enhancement of nuclear polyhedrosis virus infection by lecithin in the corn earworm, Heliothis armigera. J. Invertebr. Pathol. 52: 180-182.

140. 筒井　等，本間健平，平井剛夫．1985．十勝畑作地帯におけるトウモロコシの生育初期害虫相と主要３種の生態及び被害．北海道農試研報．144:63-76.

141. Turnock, W. J. 1988. Density, parasitism, and disease incidence of larvae of the bertha armyworm, Mamestra configurata Walker (Lepidoptera: Noctuidae), in Manitoba, 1973-1986. Can. Ent. 120: 401-413.

142. Tweeten, K. A., L. A. Bulla, Jr., and R. A. Consigli. 1980. Restriction enzyme analysis of the genomes of Plodia interpunctella and Pieris rapae granulosis viruses. Virology 104: 514-519.

143. Uchima, K., D. E. Egerter, and Y. Tanada. 1989. Synergistic factor of a granulosis virus of the armyorm, Pseudaletia unipuncta: its uptake and enhancement of virus infection in vitro. J. Invertebr. Pathol. 54: 156-164.

144. Uchima, K., J. P. Harvey, E. M. Omi, and Y. Tanada. 1988. Binding sites on the midgut cell membrane for the synergistic factor of a granulosis virus of the armyworm (Pseudaletia unipuncta). Insect Biochem. 18: 645-650.

145. Vickers, J. M., J. S. Cory, and P. F. Entwistle. 1991. DNA characterization of eight geographic isolates of granulosis virus from the potato tuber moth (Phthorimaea operculella) (Lepidoptera, Gelechiidae). J. Invertebr. Pathol. 57: 334-342.

146. Vlak, J. M. and A. Groner. 1980. Identification of two nuclear polyhedrosis viruses from the cabbage moth, Mamestra brassicae (Lepidoptera: Noctuidae). J. Invertebr. Pathol. 35: 269-278.

147. Vlak, J. M. and G. E. Smith. 1982. Orientation of the genome of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus: a proposal. J. Virol. 41: 1118-1121.

148. Vybornov, R. V., V. A. Moiseev, and V. S. Kogan. 1982. On the question of the effect of viruses of the spotted cutworm Amathes c-nigrum L. on Trichogramma (Trichogramma euproctidis Gir., Tr. evanescens Westw). Izv. Akad. Nauk Tadz. SSR. Biol. Nauk. 1: 77-81.

149. Winstanley, D. and N. E. Crook. 1993. Replication of Cydia pomonella granulosis virus in cell cultures. J. Gen. Virol. 74: 1599-1609.

150. Yamamoto, T., H. Kita, and Y. Tanada. 1979. Capsule components of two strains of a granulosis virus of the armyworm (Pseudaletia unipuncta): purification by affinity choromatography from proteinase-free capsules and analysis by peptide mapping. J. Gen. virol. 45: 371-381.

151. Yamamoto, T. and Y. Tanada. 1978. Phospholipid, an enhancing component in the synergistic factor of a granulosis virus of the armyworm, Pseudaletia unipuncta. J. Invertebr. Pathol. 31: 48-56.

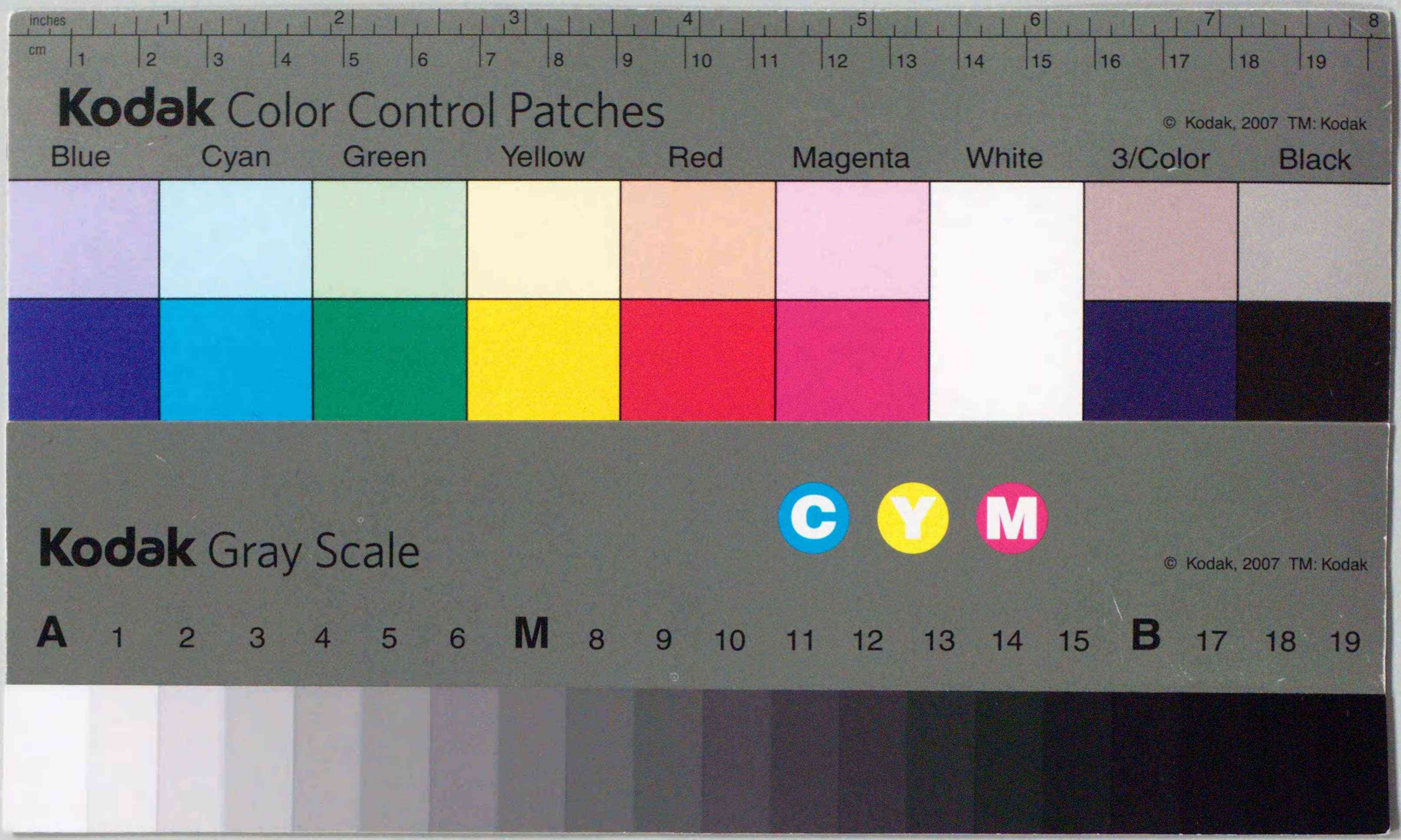
152. Yamamoto, T. and Y. Tanada. 1978. Protein components of two strains of granulosis virus of the armyworm Pseudaletia unipuncta (Lepidoptera, Noctuidae). J. Invertebr. Pathol. 32: 158-170.

153. Yamamoto, T. and Y. Tanada. 1978. Biochemical properties of viral envelopes of insect baculoviruses and their role in infectivity. J. Invertebr. Pathol. 32: 202-211.

154. Yamamoto, T. and Y. Tanada. 1979. Comparative analysis of the enveloped virions of two granulosis viruses of the armyworm, Pseudaletia unipuncta. Virology 94: 71-81.

155. 山本敬司，棚田義式. 1980. Synergistic factor（共働因子）：昆虫ウイルスにおける感染促進物質. 蛋白質 核酸 酵素 25: 133-142.

156. Zhu, Y., T. Hukuhara, and K. Tamura. 1989. Location of a synergistic factor in the capsule of a granulosis virus of the armyworm, Pseudaletia unipuncta. J. Invertebr. Pathol. 54: 49-56.


inches
cm
Kodak Color Control Patches
© Kodak, 2007 TM: Kodak
Blue
Cyan
Green
Yellow
Red
Magenta
White
3/Color
Black
Kodak Gray Scale
C
Y
M
© Kodak, 2007 TM: Kodak
A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19