3. 昆虫ボックスウイルス

福原 敏彦

(日本大学生物資源科学部)

はじめに

ボックスウイルス科 (*Poxviridae*) には、脊椎動物ボックスであるコルドボックスウイルスと昆虫ボックスウイルス (*Entomopoxvirinae*) の2亜科がある。後者には、約40種の昆虫から分離されたウイルスが所属する。宿主昆虫の分類群に対応して、ウイルス粒子やゲノムにも大 (甲虫目由来)、中 (チョウ目とバタ目由来)、小 (ハエ目由来) の違いがあるので、この亜科はさらに *Entomopoxvirus A, B, C* の3属に分けられている (表1)。昆虫ボックス特有の病徴は、感染組織内に楕円体 (spheroid) と呼ばれる卵形の細胞質封入体が現われることである。楕円体はウイルス粒子が楕円体タンパク質 (spheroidin) 中に包埋されたものである。ウイルスによっては、このほかに紡錘体 (spindle) と呼ばれる封入体が形成される。これは紡錘体タンパク質 (fusolin) のみから成っている。

10年ほど前から、昆虫ボックスウイルスの分子生物学的な研究が活発になった。発現ベクターの開発を目標とした研究が多いので、後期発現遺伝子の解析が中心となっている。このほかには、害虫防除を目標とした研究がある。この総説では、最近の研究成果を中心に紹介する。

ウイルス粒子の性状

ウイルス粒子は卵形ないし煉瓦状である (短径230-250×長径320-450nm)。超薄切片の電顕観察では^{8,20)}、粒子は中心部の電子密度の高いコア構造とその周辺の網状構造部分からなる (図1)。コアは三重の膜

に包まれていて、その片側あるいは両側に、コアの窪みに対応するように側体がある。表面は20-40nmの球形単位から成る外膜に覆われていて、桑の実のように凹凸がある。出芽型のウイルス粒子は最外層に細胞膜由来のウイルスエンベロープを持っている。ウイルス粒子内には、初期遺伝子の転写に必要なDNA依存性RNAポリメラーゼなど4種の酵素のほか約40種の構造タンパク質 (12-250 kDa) が含まれている。

Entomopoxvirus B (属) の二つのウイルス (AmEPV, HaEPV) については、ウイルスゲノムの物理的地図が作られている^{12,30)}。ゲノムは、225-233kbpの大きさの単一複鎖DNAである。GC含量は18-24%で、ワクシニアウイルス (脊椎動物ボックス) の37%に比べると低い。HaEPVゲノムの両端には、7 kbpの逆方向反復塩基配列がある³⁰⁾。

ウイルスの増殖

幼虫が経口的に取り込んだ楕円体は、中腸で消化液の作用を受けて溶解し、そのなかに包埋されているウイルス粒子が腸管内に遊離する。これが中腸皮膜組織に付着すると、細胞膜とウイルスエンベロープとの融合が起こり、コアと外側小体が細胞質に入る。やがてウイルス素材の合成が起こり、網状のウイルス産生基質 (virogenic stroma) が出現する^{9,17)}。単位膜の外側に針状体が配列した弓状の構造がその表面に現れ、両端が伸びて連ながる (図1 A, B)。その過程でウイルス産生基質の一部を取り込んで、電子密度の高い球体となる。ついで、コアと側体が分化し、粒子表面は桑実状を呈するようになる (図1 C)。成熟粒子の一部は、細胞表面に移行して、出芽により細胞外に出る。これが血体腔の感受性細胞にエンドサイトーシスにより取り込まれると、次の感染サイクルが始まる。感受性組織は主として脂肪組織であるが、ウイルスによっては血球や真皮、筋肉、気管なども侵す。

Entomopoxviruses

Tosihiko Hukuhara

College of Bioresource Sciences, Nihon University, 1866
Kameino, Fujisawa, Kanagawa 252-8510

〒252-8510 神奈川県藤沢市亀井野1866

図1 コフキコガネムシ科昆虫 (*Melolontha melolontha*) のボックスウイルス (M. Bergoin氏提供)
A. 感染した脂肪組織の細胞。細胞質のウイルス産生基質内に色々なステージの未成熟ウイルス粒子 (矢じり) が認められる。横棒は1 μm 。B. 同上 (拡大写真) 横棒は0.2 μm 。C. 成熟ウイルス粒子。三重膜構造 (矢印) に囲まれたコアと側体 (矢じり)。横棒は0.1 μm 。D. ウイルス粒子とこれを包理した楕円体。横棒は0.4 μm 。

表1 昆虫ボックスウイルスの分類

ウイルスの属名	主要な所属ウイルス名 (略名)	宿主昆虫の分類上の位置
<i>Entomopoxvirus A</i>	Melolontha melolontha entomopoxvirus (MmEPV)	甲虫目コフキコガネムシ科
<i>Entomopoxvirus B</i>	Amsacta moorei entomopoxvirus (AmEPV)	チョウ目ヒトリガ科
	Choristoneura biennis entomopoxvirus (CbEPV)	チョウ目ハマキガ科
	Choristoneura fumiferana entomopoxvirus (CfEPV)	チョウ目ハマキガ科
	Heliopsis armigera entomopoxvirus (HaEPV)	チョウ目ヤガ科
	Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus (MsEPV)	バッタ目バッタ科
	Pseudaletia separata entomopoxvirus (PsEPV)	チョウ目ヤガ科
<i>Entomopoxvirus C</i>	Chironomus luridus entomopoxvirus (CIEPV)	ハエ目ユスリカ科

感染から死亡までの期間は、チョウ目昆虫では数週間、甲虫目昆虫では感染30-40週間、バッタ目昆虫では2-6週間である。感染幼虫の発育は遅延し、一部は蛹化するが成虫になるのはまれである。感染末期には、体液が乳白色となるために体色が白色化し、皮膚が破れ易くなる。虫の活動も不活発になる。

培養細胞系での増殖は、*Entomopoxvirus B* (属) のウイルスについてのみ調べられている^{5,17,22,24})。ウイルスはエンドサイトーシスで細胞に取り込まれ、ウイルス DNA の合成は6-12時間後に始まり、24時間後に盛んになる。培養液内と細胞内のウイルス量はそれぞれ96と120時間後に最大となる。脊椎動物ボックスの増殖

表2 昆虫ボックスウイルスの楕円体タンパク質とNPHIタンパク質の類縁関係³⁰⁾

	楕円体タンパク質		
	MmEPV	CfEPV	AmEPV
<i>Heliothis armigera</i> EPV	44	79	82
<i>Amsacta moorei</i> EPV	45	77	
<i>Choristoneura fumiferana</i> EPV	44		

	NPHIタンパク質					
	ASFV*	VV	FPV	MCV	CbEPV	AmEPV
<i>Heliothis armigera</i> EPV	22	37	39	35	82	84
<i>Amsacta moorei</i> EPV	24	37	37	34	89	
<i>Choristoneura biennis</i> EPV	22	37	39	35		
伝染性軟属腫ウイルス (MCV)	20	62	61			
鶏痘ウイルス (FPV)	22	62				
ワクシニアウイルス (VV)	26					

数字は塩基配列の一致度 (%) を表す。*アフリカ豚コレラウイルス。

阻害剤であるホスホ酢酸やアラビノフラノシルシトシンやイサチンチオセミカルバゾンは昆虫ボックスウイルスの増殖も阻害する³⁵⁾。

ウイルス遺伝子とその産物

1) 楕円体タンパク質遺伝子 (*sph*)

感染細胞の細胞質中にウイルスがコードする楕円体タンパク質 (100-115kDa) が生成され、ウイルス粒子の集合部位に集積して結晶化する¹⁷⁾。その際に、数十から数百のウイルス粒子が結晶中に包埋されて楕円体 (長軸 1-25 μ m) が完成する (図1 D)。バキュロウイルス・ベクターを用いて *sph* を昆虫細胞で発現させると、ウイルス粒子を含まない卵形の構造ができるから、結晶化にはウイルス粒子の存在は必要ではないことが分かる²⁵⁾。

これまでに A 属 1 種と B 属 4 種の昆虫ボックスウイルスの *sph* の全塩基配列が判明している^{1,14,21,29,30)}。これらの塩基配列を比較すると、B 属 (CbEPV, CfEPV, AmEPV, HaEPV) の *sph* 間では、80%前後のホモロジーがある (表2)。しかし、A 属とはそれほど似ていなくて、B 属と A 属 (MmEPV) の *sph* 間のホモロジーは44-45%である。

その配列から推定すると、このタンパク質には糖鎖結合部位がある。また、システイン残基が35-46個も含まれていて、S-S 結合による立体構造の保持に役立っている。楕円体がアルカリ液中では溶解せず、還元剤の共存下ではじめて溶解するのはこの構造のためと考

えられる。5'末端の非コード領域は AT 含量が高い。また、この領域には初期発現遺伝子の転写終結シグナル (TTTTNT, N は任意の塩基) や後期発現遺伝子の転写開始シグナル (TAAATG) が認められる (図2)。

脊椎動物ボックスウイルスのなかには、A 型封入体と呼ばれる包埋体を形成するものがある。しかし、その基質タンパク質は楕円体タンパク質とは違って結晶性がなく¹⁹⁾、それをコードする遺伝子も *sph* と類似していない²⁷⁾。なお、イネの萎縮病ウイルスのコアの構造タンパク質遺伝子は *sph* とホモロジーがある⁴⁰⁾。

2) 紡錘体タンパク質遺伝子 (*fus*)

バッタ目やハエ目昆虫のウイルスは紡錘体を形成しないが、甲虫目とチョウ目昆虫のウイルスの大部分は紡錘体を形成する。この封入体は、粗面小胞体膜に囲まれた小胞のなかにウイルスがコードするタンパク質が集積して結晶化したものである^{2,20)}。楕円体タンパク質とこのタンパク質の間には、血清学的にも化学的にも類縁関係がない。

ハマキガ科昆虫のウイルス (CbEPV, CfEPV) の紡錘体は小型 (長軸が0.2-1 μ m) で、楕円体に包埋される²⁰⁾。これに比べると、甲虫目とヤガ科昆虫のウイルス (MmEPV, PsEPV, HaEPV) の紡錘体は大型 (長軸が1-15 μ m) で、楕円体に含まれることはない。3種のウイルス (CbEPV, HaEPV, MmEPV) の *fus* の全塩基配列が判明している^{4,7,38)}。なお、CbEPV の *fus* は最初 *sph* と報告されたが、後に誤認とされた¹⁾。 *fus*

```

          -40                                -1
CONSENSUS  GGATTTAATAAAAAATATTTTAAAAAAATTTTCAAATATAAATG

          -40                                -1
ATI        ACGATTTGTAGTTAAGTTTTGAATAAAATTTTTTATAATAAATG

          -40                                -1
SPH        ATCTAAAGGACTTTTTATTTTATATATTAATAATAATAAATG

```

図2 ポックスウイルスの後期発現遺伝子のプロモーター領域²²⁾

consensusはワクシニアウイルスのコンセンサス配列。ATIは牛痘ウイルスのA型封入体タンパク質遺伝子。SPHはAmEPVの楕円体タンパク質遺伝子。下線部のモチーフは翻訳開始のコドン (ATG) を含む。

はシステイン残基を多く含むタンパク質 (38-46 kDa) をコードしている。そのタンパク質のN末端のアミノ酸残基 (13-20個) はシグナルペプチドで、これはタンパク質が小胞体膜を通過したのちに切り離されるために成熟タンパク質には含まれていない。塩基配列から推定されるタンパク質は3種ウイルス間で良く似ていて、アミノ酸レベルで51%のホモロジーがある。また、核多角体病ウイルス (AcMNPV, OpMNPV) のコードする gp37 ととも37-41%のホモロジーがある^{7,10,33)}。fus のプロモーター領域には、ポックスウイルスの後期発現遺伝子によく認められる TAAATG 配列はないが、これとよく似た TAATG というシグナルがある。

アワヨトウ・ポックスウイルス (PsEPV) のウイルス粒子と紡錘体は核多角体病ウイルスの感染を増進する物質を含んでいる^{18,36,37)}。これは38kDa 糖タンパク質であって³²⁾、これをコードするウイルス遺伝子は HaEPV の sph と塩基レベルで80%という高いホモロジーを示す¹⁶⁾。PsEPV の sph のクローニングはまだ行われていないが、sph の塩基配列の保存性が高いことを考慮すると、感染増進物質をコードしている遺伝子は PsEPV の sph そのものと推定される。おそらく、ウイルス産生基質に紡錘体タンパク質が含まれていて、その一部は粗面小胞体膜に囲まれた小胞の表面に付着してその内部で結晶化するが、他の一部はウイルスの膜表面に付着して、内部に移送されてウイルスの構成成分となるのであろう。

3) チミジンキナーゼ遺伝子 (tk)

チミジンキナーゼは21kDa のタンパク質で、ポックスウイルスのデオキシヌクレオチド生合成の再利用系酵素である。3種のB属ウイルス (AmEPV, CbEPV, CfEPV) の tk の塩基配列が判明している^{11,23)}。アミノ酸レベルでのホモロジーを見ると、ハマキガ由来のウ

イルス間では98%、これらと AmEPV とは63%の一致が見られるが、脊椎動物ポックスとは43-45%の一致であり類縁性は高くない。tk が欠失したウイルスはプロモデオキシウリジン (BUdR) の存在下では tk⁻ の培養細胞で増殖できるが、tk⁺ ウイルスではできない²²⁾。これを利用して組換え体を選抜することができる。

4) ヌクレオシド3リン酸ホスホヒドラーゼI遺伝子 (NPHI)

ヌクレオシド3リン酸ホスホヒドラーゼIは、分子量76kDa のDNA依存性のATPアーゼで、前期と後期の転写速度に関係している。3種のB属ウイルス (AmEPV, CbEPV, HaEPV) の NPHI の塩基配列が判明している^{15,30,39)}。この遺伝子は sph の約300bp 下流にあり、反対方向にコードしている。読み取り枠には、ポックスウイルスの後期発現遺伝子の転写開始シグナル (TAAATG) と初期発現遺伝子の転写終結シグナル (TTTTTNT) が認められる。NPHI のアミノ酸レベルでのホモロジーを見ると、B属ウイルス間では82-89%、これらと脊椎動物ポックスウイルスの NPHI (72kDa) 間には34-39%の一致が見られるが、アフリカ豚コレラウイルス (*Iridoviridae*) の NPHI とは22-24%の一致しか認められない⁶⁾ (表2)。

5) DNAポリメラーゼ遺伝子 (pol)

DNAポリメラーゼは115kDaのタンパク質で前期機能の酵素である。CbEPVとワクシニアウイルスの pol 間には、アミノ酸レベルで25%のホモロジーしかないが、この遺伝子の保存性の高い4つの領域を比較すると32-46%のホモロジーとなる²⁶⁾。

発現ベクター

ワクシニアウイルスの組換え体で外来遺伝子を発現させる方法が開発されて間もなく、その原理を応用し

てバキュロウイルス・ベクターがつくられて広く利用されるようになった。そこで、昆虫ボックスウイルスでも封入体タンパク質をコードしている遺伝子を利用して、発現ベクターをつくらうという機運が生じた。

ボックスウイルス遺伝子の発現の程度は、プロモーターによって決まるとされているが、*sph* の場合には、その下流に残したコード配列によっても左右される²²⁾。たとえば、AmEPV の *sph* のプロモーターとそれに続くコード配列20bpを残してレポーター遺伝子をつなげると、プロモーターのみの場合に比べて昆虫細胞で8倍の発現量が認められる。残されたコード配列は、翻訳過程を増進するらしい。*sph* プロモーターは昆虫細胞に適合しているらしく、同じ挿入部分を持つワクシニアウイルスを脊椎動物細胞に接種しても、レポーター遺伝子の発現は殆ど認められない¹³⁾。これに対し、牛痘のA型封入体タンパク質遺伝子のプロモーターを使ったベクターは、昆虫細胞でも脊椎動物細胞でもレポーター遺伝子を効率良く発現させる。

CbEPV の *fus* の5'非コード領域の100bpをワクシニアの発現ベクターに挿入すると、この下流のレポーター遺伝子の発現はワクシニアの7.5kDaプロモーターを用いた場合と比べて5倍になる²⁸⁾。

おわりに

昆虫ボックスウイルスの遺伝子には、*sph* のようにこの亜科特有のもの、リファンブシン抵抗因子のように脊椎動物ボックスと共通のもの、紡錘体タンパク質のように他のグループの昆虫ウイルスと共通なもの、*NPHI* のようにさらに縁の遠いウイルスと共通なものがある。脊椎動物ボックスウイルスと共通な遺伝子の塩基配列とゲノム内配置の分析から、昆虫ボックスウイルスのA属とB属は近縁であって、脊椎動物のボックスウイルスとはかなり縁が遠いことが明らかになった。

昆虫ボックスウイルスを利用した発現ベクターを開発する上でネックになっているのは、このウイルスの増殖を支える良い培養細胞系が少ないことである。この問題が突破できれば、増殖に必須ではない後期発現遺伝子がまだ沢山あるから、バキュロウイルス・ベクターに匹敵するような発現ベクターが使えるようになるものと期待される。

昆虫ボックスウイルスで害虫を防除する研究はバタ類で進められているが³¹⁾、このウイルス病が一般に慢性の経過を辿ることから短期的な防除には向かない。核多角体病ウイルスを殺虫剤として使う研究が進

んでいるから、このウイルスの感染を増進する紡錘体タンパク質を協力剤として利用するほうが、実用化に近いと考えられる。遺伝子組換えにより、大腸菌やイネで感染増進物質をつくらせることができる(未発表)。大腸菌で量産した感染増進物質を核多角体病ウイルスと混ぜて散布すれば、単位面積当たりのウイルス散布量を大幅に減らすことが出来る。この物質を生産する組換え作物に核多角体病ウイルスを散布する方法でも、同じような効果が期待できる。

文 献

- 1) Banville, M., Dumas, F., Trifiro, S., Arif, B., and Richardson, C. (1992). The predicted amino acid sequence of the spheroidin protein from *Am-sacta moorei* entomopoxvirus: lack of homology between major occlusion body proteins of different pox viruses. *J. Gen. Virol.*, **73**, 559-566.
- 2) Bergoin, M., Devauchelle, G., and Vago, C. (1976). Les inclusions fusiformes associées à l'entomopoxvirus du Coléoptère *Melolontha melolontha*. *J. Ultrast. Res.*, **55**, 17-30.
- 3) Binns, M. M., and Smith, G. L. eds. (1992) Recombinant Poxviruses. CRC Press, Boca Raton, pp. 343.
- 4) Dall, D., Srisantha, A., Vera, A., Lai-Fook, J., and Symonds, T. (1993). A gene encoding a highly expressed spindle body of *Heliothis armigera* entomopoxvirus. *J. Gen. Virol.*, **74**, 1811-1818.
- 5) Fernon, C. A., Vera, A. P., Crnov, R., Lai-Fook, J., Osborne, R. J., and Dall, D. J. (1996). Replication of *Heliothis armigera* entomopoxvirus in vitro. *J. Invertebr. Pathol.*, **66**, 216-223.
- 6) Freije, J. M. P., Laín, S., Viñuela, E., and López-Otín, C. (1993). Nucleotidesequence of a nucleoside triphosphate phosphohydrolase gene from African swine fever virus. *Virus Res.*, **30**, 63-72.
- 7) Gauthier, L., Cousserans, F., Veyrunes, J. C., and Bergoin, M. (1995). The *Melolontha melolontha* entomopoxvirus (*MmEPV*) fusolin is related to the fusolins of lepidopteran EPVs and to the 37K baculovirus glycoprotein. *Virology*, **208**, 427-436.
- 8) Goodwin, R. H., Miller, R. J., and Beraton, C. D. (1991). Entomopoxvirinae. In "Atlas of Invertebrate Viruses" (J. R. Adams and J. R. Bonami eds.), pp. 259-285. CRC Press, Boca Raton.
- 9) Granados, R. R. (1981) Entomopoxvirus infections in insects. In "Pathogenesis of Inverte-

- brate Microbial Diseases" (E. W. Davidson ed.), pp. 102-126. Allanheld Totowa, New Jersey.
- 10) Gross, C. H., Wolgamot, G. M., Russell, R. L. Q., Pearson, M. N., and Rohrmann, G. F. (1993). A 37-kilodalton glycoprotein from a baculovirus of *Orgyia pseudotsugata* is localized to cytoplasmic inclusion bodies. *J. Virol.*, **67**, 469-475.
- 11) Gruidl, M. E., Hall, R. L., and Moyer, R. W. (1992). Mapping and molecular characterization of a functional thymidine kinase from *Amsacta moorei* entomopoxvirus. *Virology*, **186**, 507-516.
- 12) Hall, R. L., and Hink, W. F. (1990). Physical mapping and field inversion gel electrophoresis of *Amsacta moorei* entomopoxvirus DNA. *Arch. Virol.*, **110**, 77-90.
- 13) Hall, R. L., Li, Y., Feller, J., and Moyer, R. W. (1996). The *Amsacta moorei* entomopoxvirus spheroidin gene is improperly transcribed in vertebrate poxviruses. *Virology*, **224**, 427-436.
- 14) Hall, R. L., and Moyer, R. W. (1991). Identification, cloning, and sequencing of a fragment of *Amsacta moorei* entomopoxvirus DNA containing the spheroidin gene and three vaccinia virus-related open reading frames. *J. Virol.*, **65**, 6516-6527.
- 15) Hall, R. L., and Moyer, R. W. (1993). Identification of *Amsacta moorei* spheroidin-like protein within the occlusion bodies of *Choristoneura fumiferana* entomopoxvirus. *Virology*, **192**, 179-187.
- 16) Hayakawa, T., Xu, J., and Hukuhara, T. (1996). Cloning and sequencing of the gene for an enhancing factor from *Pseudaletia separata* entomopoxvirus. *Gene*, **177**, 269-270.
- 17) Hukuhara, T., Xu, J., and Yano, K. (1990). Replication of an entomopoxvirus in two lepidopteran cell lines. *J. Invertebr. Pathol.*, **56**, 222-232.
- 18) Hukuhara, T., Yano, K., Xu, J., Tomita, M., and Miyajima, S. (1995). Detection of a virus enhancing factor in inclusion bodies of an entomopoxvirus by immunoelectron microscopy. *J. Invertebr. Pathol.*, **65**, 315-317.
- 19) Ichihashi, Y., and Dale, S. (1973). Biogenesis of poxviruses: relationship between a translation complex and formation of A-type inclusions. *Virology*, **51**, 297-319.
- 20) Kurstak, E., and Garzon, S. (1977). Entomopoxviruses (poxviruses of invertebrates). In "The Atlas of Insect and Plant Viruses" (K. Maramorosch ed.), Academic Press, New York. pp. 29-66.
- 21) Li, X., Barrett, J. W., Yuen, L., and Arif, B. M. (1997). Cloning, sequencing and transcriptional analysis of the *Choristoneura fumiferana* entomopoxvirus spheroidin gene. *Virus Res.*, **47**, 143-154.
- 22) Li, Y., Hall, R. L., Yuan, S. L., and Moyer, R. W. (1998) High-level expression of *Amsacta moorei* entomopoxvirus spheroidin depends on sequences within the gene. *J. Gen. Virol.*, **79**, 613-622.
- 23) Lytvyn, V., Fortin, Y., Banville, M., Arif, B., and Richardson, C. (1992). Comparison of the thymidine kinase genes from three entomopoxviruses. *J. Gen. Virol.*, **73**, 3235-3240.
- 24) Marlow, S. A., Billam, L. J., Palmer, C. P., and King, L. A. (1993). Replication and morphogenesis of *Amsacta moorei* entomopoxvirus in cultured cells of *Estigmene acrea* (salt march caterpillar). *J. General. Virol.*, **74**, 1457-1461.
- 25) Marlow, S. A., Wilson, L. E., Lawrie, A. M., Wilkinson, N., and King, L. A. (1998). Assembly of *Amsacta moorei* entomopoxvirus spheroidin into spheroids following synthesis in insect cells using a baculovirus vector. *J. Gen. Virol.*, **79**, 623-628.
- 26) Mustafa, A., and Yuen, L. (1991). Identification and sequencing of the *Choristoneura biennis* entomopoxvirus DNA polymerase gene. *J. DNA Sequencing & Mapping*, **2**, 39-45.
- 27) Patel, D. D., Pickup, D. J., and Joklik, W. K. (1986). Isolation of cowpox virus A-type inclusions and characterization of their major protein component. *Virology*, **149**, 174-189.
- 28) Pearson, A., Richardson, C., and Yuen, L. (1991). The 5' noncoding region sequence of the *Choristoneura biennis* entomopoxvirus spheroidin gene functions as an efficient late promoter in the mammalian vaccinia expression system. *Virology*, **180**, 561-566.
- 29) Sanz, P., Veyrunes, J.-C., Cousserans, F., and Bergoin, M. (1994). Cloning and sequencing of the spherulin gene, the occlusion body major polypeptide of the *Melolontha melolontha* entomopoxvirus (*MmEPV*). *Virology*, **202**, 449-457.
- 30) Sriskantha, A., Rebecca, J., and Dall, D. J. (1997). Mapping of the *Heliothis armigera* entomopoxvirus (HaEPV) genome, and analysis of genes encoding the HaEPV spheroidin and nucleoside triphosphate phosphohydrolase I proteins. *J. Gen. Virol.*, **78**, 3115-3123.
- 31) Street, D. A., Woods, S. A., and Erlandson, M. A. (1997). Entomopoxviruses of grasshoppers

- and locusts; biology and biological control potential. *Memoirs Entomol. Soc. Canada* **171**, 115-130.
- 32) Tomita, M., Takahashi, Y., Hukuhara, T., and Miyajima, S. (1998). Serological relationship between inclusion body proteins and a virus enhancing factor of an entomopoxvirus. *Appl. Entomol. Zool.*, **33**, 277-280.
- 33) Vialard, J. E., Yuen, L., and Richardson, C. D. (1990). Identification and characterization of a baculovirus occlusion body glycoprotein which resembles spheroidin, and entomopoxvirus protein. *J. Virol.*, **64**, 5804-5811.
- 34) Wijonarco, A., and Hukuhara, T. (1998). Detection of a virus enhancing factor in the spheroid, spindle and virion of an entomopoxvirus. *J. Invertebr. Pathol.*, in press.
- 35) Winter, J., Hall, R. L., and Moyer, R. W. (1995). The effect of inhibitors on the growth of the entomopoxvirus from *Amsacta moorei* in *Lymantria dispar* (gypsy moth) cells. *Virology*, **211**, 462-473.
- 36) Xu, J., and Hukuhara, T. (1992). Enhanced infection of a nuclear polyhedrosis virus in larvae of the armyworm, *Pseudaletia separata*, by a factor in the spheroids of an entomopoxvirus. *J. Invertebr. Pathol.*, **60**, 259-264.
- 37) Xu, J., and Hukuhara, T. (1994). Biochemical properties of an enhancing factor of an entomopoxvirus. *J. Invertebr. Pathol.*, **63**, 14-18.
- 38) Yuen, L., Dionne, J., Arif, B., and Richardson, C. (1990). Identification and sequencing of the spheroidin gene of *Choristoneura biennis* entomopoxvirus. *Virology*, **175**, 127-433.
- 39) Yuen, L., Noiseux, M., and Gomes, M. (1991). DNA sequence of the nucleoside triphosphate phosphohydrolase I (NPH I) of the *Choristoneura biennis* entomopoxvirus. *Virology*, **182**, 403-406.
- 40) Zhang, F., Li, Y., Liu, Y., An, C., Chen, Z. (1997). Molecular cloning, sequencing, functional analysis and expression in *E. coli* of major core protein gene (S3) of rice dwarf virus chinese isolate. *Acta virologica* **41**, 161-168.