

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07626

研究課題名(和文)産雌性単為生殖を行うヨコバイ類に関する基礎的研究

研究課題名(英文)Taxonomic and ecological study of parthenogenesis leafhoppers

研究代表者

紙谷 聡志(Kamitani, Satoshi)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：80274520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：産雌性単為生殖を行うヨコバイ類に関して、沖縄本島においてマダラヒメヨコバイの一種の分類学・生態学的研究を行った。このヨコバイは、これまで数多くの個体を採集したが、雌しか採集できておらず、産雌性単為生殖を行うことが予想されている。分類学的な研究では、外部形態の特徴からDiommaもしくはKusalaに類似する属・種であるが判明したが、雄交尾器が検討できないことから分類がこれ以上行えない状況である。生態としては、ウラジロエノキからのみ採集されることから、本種を与えて飼育を行ったが、産卵・孵化には至らなかった。このことから、ウラジロエノキと同様な環境に真の寄主植物であると思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

共生細菌による昆虫の単為生殖化は、おもに半数性の寄生蜂やアザミウマで知られている。しかし、日本から発見されたヨコバイは、倍数性であるにもかかわらず共生細菌によって単為生殖化していることが明らかになった。このような現象は世界でも極めて稀である。生殖様式の変化は、農業害虫もしくは天敵に大きな影響を及ぼすため、基礎的な研究は非常に重要である。

研究成果の概要(英文)：No males of thyphlocybine leafhopper from Okinawa Island have been collected, although many field surveys were performed. Therefore, it might be parthenogenesis. The taxonomic position of this leafhopper was identified as the genus Diomma or Kusala. But, the important taxonomic character, male genitalia, is unknown. It was collected from Trema orientalis (Cannabaceae). As it could not rear on this tree, the host plant is another one.

研究分野：昆虫分類学

キーワード：産雌性単為生殖 農業害虫 共生細菌 倍数性 生殖様式

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

昆虫の単為生殖は、寄生蜂類、ダニ類、アザミウマ類などにみられる半数倍数性の産雌性単為生殖が有名であるが、増殖中のアブラムシ類などにみられる倍倍数性の産雌性単為生殖や休眠卵生産直前のアブラムシ類にみられる両性単為生殖もある。とくに、カメムシ目腹吻亜目では、アブラムシ上科のみならず、カイガラムシ上科、キジラミ上科、コナジラミ上科などで広く産雌性単為生殖が確認されている。しかし、異翅亜目(カメムシ類)および顎吻亜目(ウンカ・ヨコバイ類)では、極端な性比の偏りを生じている種は多く知られているものの産雌性単為生殖を行う種はこれまで知られていなかった。

ヨコバイ科では、これまで、メスしか採集されていない種が複数知られているが、オスの活動時期はメスと比べると限定的であることがほとんどであるため不適切な採集時期による結果もしくは、極端な性比の偏りによるサンプリングエラーと解釈されてきた。しかし、対馬および九州等の西日本に分布するオカモトフタテンヒメヨコバイ *Arboridia okamotoi* の個別飼育によって、本種が倍倍数性の産雌性単為生殖をしていることが明らかとなった。

共生細菌による宿主の生殖操作は現在 50 種以上の昆虫(ほとんどは半数倍数性単為生殖の寄生蜂で、この他は同じく半数倍数性単為生殖のアザミウマとダニのみ)で確認されており、共生細菌が存在することで宿主は未交尾でも雌を産むようになる。一方、産雌性単為生殖の研究が盛んなアブラムシ類などは *Buchnera* や *Wolbachia* などの共生細菌が感染していることが知られているが、これらは宿主の生理的特性に大きく関与することが明らかにされているものの、単為生殖との関係は明らかにされていない。ヨコバイ類では、イタリア産のヒメヨコバイの 1 種 *Zyginidia* で、*Wolbachia* による影響でオスのメス化、極端な性比の偏りが確認されているのみで、単為生殖との関係は知られていない(Negri et al. 2003)。

オカモトフタテンヒメヨコバイの産雌性単為生殖は、倍倍数性の昆虫に対する *Wolbachia* による単為生殖化を初めて明らかにした例となる可能性が高いといえる(これまで、トビムシ等でも *Wolbachia* との関係性を指摘した先行研究があるが、他の共生細菌との関係や除去実験等の不備のため直接的な関係を明らかにしていない)。なお、日本ではフタテンヒメヨコバイ属 *Arboridia* では、オカモトフタテンヒメヨコバイでは *Wolbachia* によって生殖操作されており、近縁種フタテンヒメヨコバイ *A. apicalis* は未感染で両性生殖をしていることが確認されている(韓国においては、この繁殖様式が逆になっているという、現地研究者 Dr. Jung の私見が寄せられている)。なお、本種はヒメヨコバイ亜科に分類されるヨコバイで、他の亜科のヨコバイと異なり、師管液や導管液の吸汁を行わず、植物の細胞内の細胞質を吸汁するという食性をもっている。このため、アブラムシや他のヨコバイで必至な *Buchnera* が共生していない。また、寄主植物であるブドウ類の葉を、真っ白になるまで加害するため、韓国ではブドウの害虫として知られている。ブドウは水差し状態で長期間保存できるため、本種の室内飼育が可能であり、個別累代飼育が可能である。

### 2. 研究の目的

#### (1)ヨコバイ科の他種における単為生殖の可能性

ヨコバイ科には、これまで分類学的研究の過程でメスのみしか採集されていない種が数種知られている。現在、研究代表者は、日本産ヨコバイ科全体の再検討の課程で各種のオス交尾器の再検討を行っている。しかし、既知種および未記載種の中には、オス交尾器の記載がこれまで全く知られていないものがある。とくに、沖縄本島から確認されているマダラヒメヨコバイの一種 *Diomma* sp. は、オカモトフタテンヒメヨコバイと同じく 1,000 個体以上の標本があるにもかかわらずオスが確認されていない。また、上述のように韓国においてはフタテンヒメヨコバイ *A. apicalis* が産雌性単為生殖をしているという私見が得られている。さらに、九州大学および東京農業大学(林正美コレクション)に収蔵されているヨコバイ科標本を精査し、原記載以降オスが採集されていない種の絞り込みを行う。

対象種について野外採集を行い、国産種については個別飼育による産雌性単為生殖の確認を行うとともに、*Wolbachia* の *wsp* 遺伝子の PCR を用いてオカモトフタテンヒメヨコバイと同様の共生細菌相が感染しているかを明らかにする(同時に、生殖操作を行うことが知られている *Arsenophorus*, *Cardinium*, *Flavobacterium*, *Rickettsia*, *Spiroplasma* の感染の有無も明らかにする)。

#### (2)共生細菌除去個体への再感染・近縁種への水平伝播

本種の共生細菌類はテトラサイクリンの投与により除去され、ゲンタマイシンでは除去できないことが確認されている。寄生蜂などでは性比の回復等がみられるようになるが、倍倍数性のヨコバイが共生細菌によって単為生殖化が操作されている場合には、産下される卵はいずれも半数体となり孵化しないことを確認している。

オカモトフタテンヒメヨコバイおよび近縁種フタテンヒメヨコバイ *A. apicalis* (*Wolbachia* 非感染・両性生殖)の大量飼育系の確立を行う。これまでの問題点であった餌の不足を解決するために圃場整備を行い、恒温条件下で多数の個体を個別飼育するための機器の追加が必要である。炭酸ガス麻酔を行った成虫腹部から細胞質を吸引し、テトラサイクリンを投与して共生細菌を除去した幼虫、羽化 24 時間以内の成虫に、共生細菌混濁液をマイクロインジェクションし、再感染を試みる。最も、再感染の効率が良い方法を明らかにする。

#### (3)半翅目天敵への水平伝播の可能性

天敵カメムシ類へ共生細菌混濁液をマイクロインジェクションし、水平伝播を試みる。

### 3. 研究の方法

目的を達成するために4つの研究計画を立案した。1)ヨコバイ科の他種における単為生殖の可能性、2)共生細菌除去個体への再感染・近縁種への水平伝播、3)半翅目天敵への水平伝播の可能性に関する研究を行う。

これまで野外調査により、産雌性単為生殖を行っている可能性が非常に高い *Diomma* sp.は、沖縄本島のウラジロエノキを寄主植物としていることまであきらかにしている。オカモトフタテンヒメヨコバイに加えて、この種の飼育系統を確立し、産雌性単為生殖および共生細菌との関係を明らかにする。

再感染・水辺伝播に関する研究は、オカモトフタテンヒメヨコバイに加えてフタテンヒメヨコバイの飼育系統を確立した後に、実験を開始する。天敵カメムシ類については、福岡県総合農業試験場で飼育されているハナカメムシ類を使用する。

#### ヨコバイ科の他種における単為生殖の可能性

現時点で最も可能性の高いマダラヒメヨコバイの一種 *Diomma* sp.を飼育するために、ウラジロエノキの栽培を九州大学実験圃場において行う。苗の育苗については沖縄県森林資源研究センター(2012)をもとにする。6月、既知山地である沖縄本島名護市において幼虫・成虫の採集を行い、実験室へ持ち帰り、個別飼育を行い、産雌性単為生殖の確認を行う。また、産雌性単為生殖の確認が得られた個体について、wspのPCRを行い、*Wolbachia*の感染の有無を確認する。ただし、ウラジロエノキの水差し・幼苗の維持が困難であった場合は、次年度も引き続き実験を継続する。

日本産ヨコバイ科の原記載・再記載を確認し、オス交尾器の観察が行われていない種の絞り込みを行う。とくに、松村松年博士が記載した種はメスをタイプとしたものも多く、原記載以降の分類学的研究が行われていないものもある。そこで、そのような種、例えば、*Deltocephalus ogumae*等について、一般標本の有無を九州大学および東京農業大学のコレクションを調査し、産雌性単為生殖の可能性を検討する。11-2月、東京農業大学へ滞在し、標本調査を行う。

韓国においてフタテンヒメヨコバイ類の性比調査、共生細菌の感染調査を8月に行う。これまでの予備調査によって、韓国北東部・襄陽郡の海岸では、*Wolbachia*非感染のオカモトフタテンヒメヨコバイが3個体採集された。ここでは、オスも2個体確認出来たことから、産雌性単為生殖と両性生殖が混在している可能性が考えられる。今年度は、当地において多数の個体を採集し、性比、感染割合をあきらかにする。また、フタテンヒメヨコバイの採集も同地で行い、性比、感染割合をあきらかにする。

### 4. 研究成果

#### (1)抗生物質テトラサイクリン処理

コントロール区とテトラサイクリン区について、実験個体の幼虫期間(発育速度)とカップごとの羽化率を記録した。幼虫期間の平均はコントロール区が17.32日、テトラサイクリン区が17.68日であり、テトラサイクリン区の方が羽化までの日数が長い傾向があったが、両者に有意な差は見られなかった(Student's t-test,  $p=0.112$ )。全体の羽化率はコントロール区で49.2%( $N=189$ )、テトラサイクリン区で43.9%( $N=189$ )であり、有意な差は見られなかった(Welch's t-test,  $p=0.425$ )。両実験区より得られた羽化成虫の*Wolbachia*の感染状況を確認したところ、コントロール区の飼育個体はすべての個体が感染していた。一方、テトラサイクリン区の個体は*Wolbachia*に感染していなかった。

さらに、両実験区の羽化個体を個別飼育し、次世代を産出できるかどうかを確認した。羽化後14日までの生存率は、コントロール区が71.4%( $N=14$ )、テトラサイクリン区が66.7%( $N=36$ )であり、有意な差は見られなかった(Fisher's exact test,  $p>0.1$ )。実験区から得られた成虫を28日間個別飼育した結果、コントロール区の11個体はすべて次世代を産出し、それらはすべてメスであった。一方で、テトラサイクリン区の14個体はまったく次世代を産出しなかった(表6)。これらの個別飼育個体のうち、コントロール区の11個体のみすべて*Wolbachia*に感染していた。

#### (2) *Wolbachia*の感染とオカモトフタテンヒメヨコバイの生殖様式

2013年の韓国における調査から、3地点で計149個体のオカモトフタテンヒメヨコバイを得ることができた。このうち、ヤンヤン群で採集された2個体はオスであった。これまでの日本における調査では、採集された約1,000個体はすべてメスであり、オスは確認されていない。また、*Wolbachia*の感染を調査したところ、ヤンヤン群で採集された2個体のオスと1個体のメスは*Wolbachia*に感染していなかった。これらの結果から、韓国では*Wolbachia*に感染していない本種の個体群が維持されていると考えられる。さらに、この個体群(ヤンヤン群産)にオスが含まれることから、*Wolbachia*非感染系統は単為生殖ではなく、両性生殖を行っている可能性がある。一方で、*Wolbachia*は産雌性単為生殖化などの生殖操作を行う細菌であることから(Werren 1997; Stouthamer et al. 1999)、韓国産の個体についても産雌性単為生殖と*Wolbachia*に深い関係があることを示唆している。また、分子系統解析の結果、日本と韓国の個体群は同じ*Wolbachia*系統に感染していることが明らかになった(図6)。NCBIによるBlast検索から、この*Wolbachia*はB群に属しており、現在までに塩基配列が公開されているどの系統とも異なっていた。今回新たに

発見された未知の *Wolbachia* が、両性生殖種を単為生殖化できるのかについては、今後実験的に確かめてゆく必要がある。



図. オカモトフタテンヒメヨコバイ

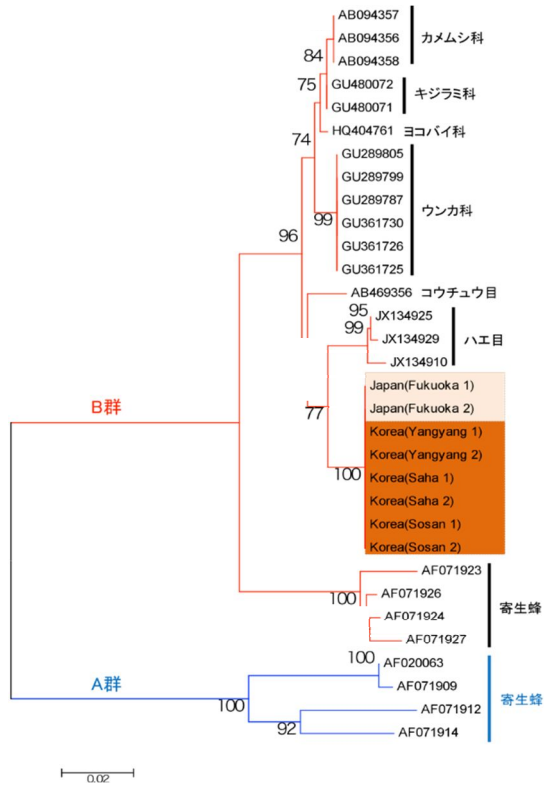


図. wsp 領域を用いた *Wolbachia* の分子系統樹 (近隣結合法, 552bp.)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 SATOSHI KAMITANI	4. 巻 4508
2. 論文標題 First record of the alien bamboo leafhopper, <i>Branchana xanthota</i> , in Japan (Hemiptera: Cicadellidae: Deltocephalinae)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Zootaxa	6. 最初と最後の頁 579-581
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.4508.4.7">http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.4508.4.7</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 紙谷聡志
2. 発表標題 中国の半翅目
3. 学会等名 日本半翅類学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 紙谷聡志
2. 発表標題 日本産ヨコバイ族の分類学的再検討（カメムシ目：ヨコバイ科）
3. 学会等名 日本昆虫学会第77回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kurahashi T, Kumashiro S, Kamitani S and Ohara N
2. 発表標題 Relationship between parthenogenetic leafhopper, <i>Arboridia okamotonis</i> , and <i>Wolbachia</i> Parthenogenesis of leafhopper, <i>Arboridia okamotonis</i> , caused by <i>Wolbachia</i> ?
3. 学会等名 International Congress of Entomology 2016（国際学会）
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----