

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03004

研究課題名(和文)ピロウドカミキリからマツノマダラカミキリへ - 細胞内寄生細菌の人為的導入 -

研究課題名(英文)Artificial introduction of an intracellular symbiont from *Acalolepta fraudatrix* to *Monochamus alternatus*

研究代表者

相川 拓也 (Aikawa, Takuya)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等

研究者番号：90343805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年、宿主に生殖異常をもたらすボルバキアを、害虫に対する生物的防除資材として利用する試みが様々な昆虫を対象に検討されている。本研究では、ピロウドカミキリ由来のボルバキアを、マツ材線虫病の媒介昆虫であるマツノマダラカミキリの卵にマイクロインジェクション法により注入し、ボルバキアを定着させることを目的とした。ボルバキアをインジェクションした卵のうち、成虫まで発育した個体の割合は13%、そしてボルバキアに感染していた成虫の割合は0.6%であった。このように、上法によりピロウドカミキリ由来のボルバキアをマツノマダラカミキリに定着させることはできたが、そのボルバキアは次世代の個体には移行しなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、マイクロインジェクション法を用いることで、ピロウドカミキリ由来のボルバキアをマツノマダラカミキリに導入できることが示された。これはマツ材線虫病の防除対策としてボルバキアを利用するための大きな一歩であると言える。また、マツノマダラカミキリの細胞培養に成功し、かつ、その細胞にボルバキアを感染させることができた。将来、マツノマダラカミキリの細胞に馴化したこのボルバキアを、マツノマダラカミキリ個体に定着させることができれば、ボルバキアに感染したマツノマダラカミキリ系統の確立につながるかも知れない。

研究成果の概要(英文)：In recent year, many attempts have been examined to use *Wolbachia*, which causes reproductive alteration in the hosts, as a biological control agent against pests. In this study, *Wolbachia* derived from *Acalolepta fraudatrix* was injected into eggs of *Monochamus alternatus*, which is the vector of pine wilt disease, by the microinjection method to establish *Wolbachia*-infected strain of *M. alternatus*. Of the *Wolbachia*-injected eggs, the percentage of individuals that developed to adults was 13%, and the percentage of adults infected with *Wolbachia* was 0.6%. *Wolbachia* derived from *A. fraudatrix* could be fixed in *M. alternatus*, but the *Wolbachia* did not transfer to the next generation offspring via infected females.

研究分野：森林保護、森林昆虫学、線虫生態学、分子生物学

キーワード：ボルバキア ピロウドカミキリ マツノマダラカミキリ マイクロインジェクション

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ボルバキアは主に昆虫類の細胞内に寄生する細菌で、全昆虫種の 20～60%がこの細菌に感染していると考えられている。この細菌は宿主昆虫に生殖異常をもたらすことで知られている。その生殖異常には幾つかタイプがあり、1) 細胞質不和合(感染雄と非感染雌との間で次世代を作らせない) 2) 雄殺し(雄に発育すべき卵を孵化させない) そして 3) 雄の雌化(遺伝的には雄でも雌に発育させる)などが挙げられる。このように、ボルバキアは宿主昆虫の生殖機能を著しく攪乱する性質を持つことから、衛生害虫あるいは農業害虫に対する生物的防除資材としての利用も期待されるなど応用的な分野でも脚光を浴びている。

申請者はこれまで、日本最大の森林病害であるマツ材線虫病に関する研究に従事してきた。その中のテーマの 1 つとして、本病を媒介するマツノマダラカミキリ(写真 1)に対し、このボルバキアを生物的防除資材として利用するための技術開発を模索し続けてきた。すなわち、他の昆虫種に寄生しているボルバキアをマツノマダラカミキリに導入することで、マツ材線虫病を抑え込むことはできないだろうか、という発想である。そのような中、申請者はマツノマダラカミキリと同様にマツ類を宿主とする森林昆虫の一種ビロウドカミキリ(写真 2)にボルバキアが感染していることを明らかにし、さらに、このボルバキアは宿主であるビロウドカミキリに細胞質不和合を引き起こすことを示した。



写真 1 マツノマダラカミキリ成虫



写真 2 ビロウドカミキリ成虫

2. 研究の目的

このように、マツノマダラカミキリと同じカミキリムシ科の昆虫であるビロウドカミキリで細胞質不和合、すなわち不妊化を引き起こすボルバキアが検出された。そこで本研究では、このビロウドカミキリに感染しているボルバキアを、マツノマダラカミキリに導入することを目的とした。

3. 研究の方法

異種昆虫間のボルバキアの導入では、一般的にマイクロインジェクションという方法が使われる。これは、ドナー種由来のボルバキアをマイクロキャピラリー(微細なガラス針)を用いて、ターゲットとなるレシピエント種にインジェクションするという手法である。本研究では、以下の 2 つのインジェクション方法を試すことにした。1 つは、ドナー種であるビロウドカミキリの体内組織から取り出したボルバキアをレシピエント種であるマツノマダラカミキリの卵に直接注入する方法である。これは、様々な昆虫種で実施されている手法である。2 つ目は、あらかじめマツノマダラカミキリの培養細胞を作成し、その細胞にビロウドカミキリのボルバキアを感染させた後、その感染細胞由来のボルバキアをマツノマダラカミキリの卵に同じくマイクロインジェクション法を使ってインジェクションするという手法である。これは、ドナー種由来のボルバキアをレシピエント種に直接インジェクションするよりも、事前に培養しておいたレシピエント種の細胞にボルバキアを感染させ馴化させておくことで、レシピエント種へインジェクションした後の定着率を向上させようとする技術である。

4. 研究成果

(1) マツノマダラカミキリ卵への悪影響が少ないマイクロインジェクション法の検討

ボルバキアのインジェクション実験を行う前に、マツノマダラカミキリの卵にできるだけ悪影響を与えないインジェクション法を検討するため、マイクロキャピラリーの形状とキャピラリーを打ち込む卵の位置について検討を行った。注入物は PBS 溶液とした。マイクロキャピラリーの形状については、先端がより細い(尖っている)キャピラリーの方が卵の孵化率が高くなった。また、キャピラリーを打ち込む卵の位置については孵化率に大きな違いはなかった。最終的に、細いマイクロキャピラリーを用いてインジェクションすることで約 8 割の卵の孵化に成功した。この孵化率は、通常のマツノマダラカミキリの卵の孵化率と大差がないことから、この手順でイ

ンジェクションを行うことで、マツノマダラカミキリの卵に対するインジェクションの影響は最小限に抑えられるものと推測された。

(2) ピロウドカミキリからマツノマダラカミキリへのボルバキアの直接導入

(1)の結果を受け、先端が細いマイクロキャピラリーを用い、また、マツノマダラカミキリ卵へのインジェクションは卵の端に行うことにした(写真3、4)。合計3度のインジェクション実験を実施した。

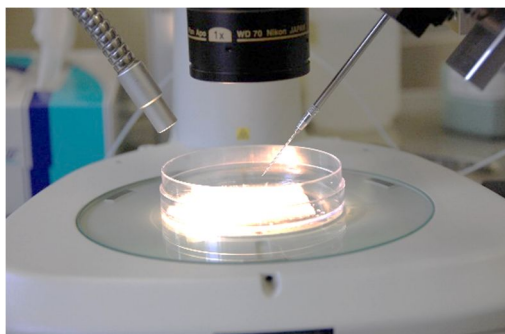


写真3 顕微鏡下でインジェクションをしている様子。左側から光を当て、右側のマイクロキャピラリーで卵にボルバキアをインジェクションする。

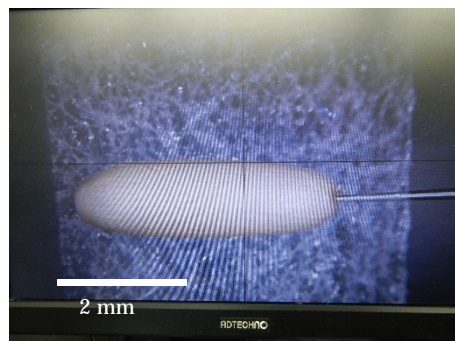


写真4 マツノマダラカミキリの卵にマイクロキャピラリーを右側から打ち込んでいる様子。

1回目はピロウドカミキリ終齢幼虫の脂肪体からボルバキアを抽出・精製してボルバキア溶液を作製し、その溶液をマツノマダラカミキリの受精卵にインジェクションした。合計160個のマツノマダラカミキリ卵にインジェクションを行ったところ、そのうちの61個体(38%)が孵化した。(1)の実験における孵化率は80%であったことから、ボルバキア溶液がマツノマダラカミキリの卵の発育に大きなダメージを与えたことにより孵化率が低下したと推測された。また、成虫まで発育した個体は36個体(22.5%)で、ボルバキアに感染していたのは3個体(雄1頭、雌2頭)(1.9%)であった。その感染雌成虫2頭が産んだ卵にボルバキアは移行しなかった。

2回目の実験では、ピロウドカミキリ雌成虫の卵巣(未受精卵を含む)からボルバキアを抽出・精製し、その溶液をインジェクションに用いた。合計333個のマツノマダラカミキリ卵に対しインジェクションを行ったところ、孵化したのは70個体(21%)となり、終齢幼虫の脂肪体由来のボルバキアを用いた時よりも孵化率が低下した。また、成虫まで発育した個体も29個体(8.7%)で、この値も前回より低くなった。最終的にボルバキアの感染が確認できた個体はわずか1個体(雌1頭)(0.3%)であり、その感染雌は卵を生産しなかった。

3回目の実験では、ボルバキアの抽出源を再度終齢幼虫の脂肪体に戻しインジェクションを行った。合計450個のマツノマダラカミキリ卵に対しインジェクションを行ったところ、238個体(52.9%)が孵化した。これは3回実施した実験の中で最も高い数値であり、ボルバキアの抽出源を終齢幼虫の脂肪体にしたことで、孵化率が上昇したものと思われる。現在、これらの幼虫は、人工飼料上で飼育しており、今後成虫に発育させた後、ボルバキア感染の有無を確認する予定である。

(3) マツノマダラカミキリの培養細胞由来のボルバキアを用いた導入

マツノマダラカミキリの前蛹脂肪体を用いて細胞の培養を開始した。初期段階で細胞の増殖が順調であっても、次第に増殖しなくなる株も多くあり、最終的に2株の培養細胞を樹立することに成功した。この2株はマツノマダラカミキリ終齢幼虫の同じ組織由来であったが、増殖速度や細胞の形状が異なっていた。この2株のうちの1つは、順調に細胞が増殖し、増殖スピードも徐々に速くなった(写真5)。1~2週間程度で植え継ぎができる程度に増殖が安定したところで、ピロウドカミキリ由来のボルバキアの感染を試みた。その結果、培養細胞内にボルバキアが感染していることが診断PCRにより明らかになり、透過電子顕微鏡による観察でも、細胞内のボルバキアの存在が確認された(写真6)。ボルバキアが感染した後も、細胞の増殖に特に問題はなかったことから、マツノマダラカミキリ卵へのインジェクション実験に向けて、培養細胞からのボルバキア抽出・精製法の検討を行った。その結果、ボルバキア感染細胞培養液1mlあたり、 5×10^8 個(細胞当たり100個程度)のボルバキアを得ることに成功した。また、ボルバキア感染細胞をジルコニアビーズ(径1mm)とともにボルテックスミキサーで攪拌し、細胞を破碎後、遠心処理およびフィルター処理をすることにより、インジェクションに用いるボルバキア溶液を効率よく調整できることが明らかとなった。

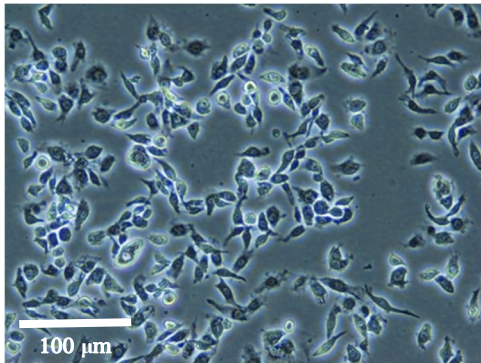


写真5 マツノマダラカミキリの培養細胞

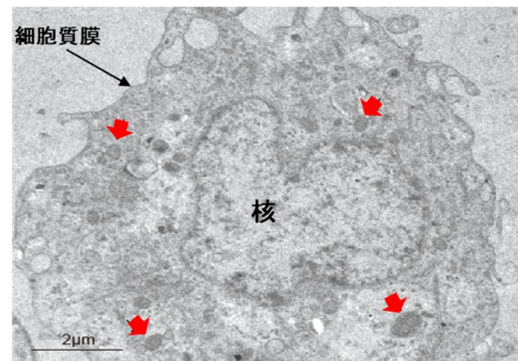


写真6 マツノマダラカミキリの培養細胞に感染しているボルバキア（赤矢印）

(4) 研究の総括

ピロウドカミキリから抽出したボルバキアをマツノマダラカミキリの卵に直接インジェクションする方法を用いることで、低率ではあるが、ボルバキアに感染したマツノマダラカミキリ成虫を作ること成功した。その中で、ボルバキアに感染した雌成虫が3頭得られたものの、これら3頭の雌成虫のうち2頭が産んだ卵からはボルバキアが検出されず、また、1頭は卵を産まなかった。このように、直接インジェクションした個体にはボルバキアを定着させることができたが、次世代へのボルバキアの感染は確認できなかった。他のマイクロインジェクション実験の報告を見ても、異種昆虫間でのボルバキアの導入は決して容易ではなく、レシピエント種における定着率は高くはない。よって、ボルバキアに感染したマツノマダラカミキリ系統を確立するためには、数多くの卵にインジェクションを行い、ボルバキア感染個体を少しでも多く得ることが重要であると考えられる。なお、3回目の実験は現在も継続中であり、これまでに行った実験よりも孵化率が高い結果となっていることから、ボルバキアに感染した成虫個体が多く確保できることを期待している。また、本研究課題の中で、マツノマダラカミキリの培養細胞株を樹立することに成功した。これまでにカミキリムシ科昆虫由来の培養細胞は3種しか報告されておらず、この短期間にマツノマダラカミキリの培養細胞を樹立できたことは大きな成果であると考えている。さらに、本研究では、このマツノマダラカミキリ培養細胞株にピロウドカミキリ由来のボルバキアを感染させることにも成功した。これはカミキリムシ科昆虫では初めての報告である。しかし、培養細胞由来のボルバキアをマツノマダラカミキリの卵にインジェクションするまでには至らなかった。培養細胞由来のボルバキアを用いたマツノマダラカミキリ卵へのインジェクション実験については今後取り組むべき課題であると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Aikawa Takuya, Maehara Noritoshi, Ichihara Yu, Masuya Hayato, Nakamura Katsunori, Anbutsu Hisashi	4. 巻 17
2. 論文標題 Cytoplasmic incompatibility in the semivoltine longicorn beetle <i>Acalolepta fraudatrix</i> (Coleoptera: Cerambycidae) double infected with <i>Wolbachia</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0261928
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0261928	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ozawa Sota, Maehara Noritoshi, Aikawa Takuya, Yanagisawa Kenichi, Nakamura Katsunori	4. 巻 23
2. 論文標題 Occurrence of two species of <i>Bursaphelenchus</i> (Nematoda: Aphelenchoididae) in the reproductive organs of <i>Monochamus saltuarius</i> (Coleoptera: Cerambycidae)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nematology	6. 最初と最後の頁 485-494
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1163/15685411-bja10054	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 -

1. 著者名 Aikawa T., Ozawa S., Maehara N., Masuya H., Nakamura K., Kanzaki N.	4. 巻 22
2. 論文標題 Discovery of a phoretic association between <i>Bursaphelenchus doui</i> (Nematoda: Aphelenchoididae) and <i>Monochamus saltuarius</i> and <i>Acalolepta sejuncta</i> (Coleoptera: Cerambycidae)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nematology	6. 最初と最後の頁 713-722
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1163/15685411-00003334.	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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 相川拓也、安佛尚志、高務淳
2. 発表標題 ピロウドカミキリのボルバキアをマツノマダラカミキリの卵に注入する試み
3. 学会等名 日本森林学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安佛尚志、西川洋平、小川雅人、井手圭吾、相川拓也、竹山春子
2. 発表標題 微小液滴を用いたシングルセル技術による難培養性昆虫共生細菌の全ゲノム解析
3. 学会等名 日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊和代、高務淳、相川拓也、粥川琢巳
2. 発表標題 マツノマダラカミキリ由来培養細胞の樹立
3. 学会等名 日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相川拓也、前原紀敏
2. 発表標題 マツ枯死木から採集されるカミキリムシ科幼虫の識別法
3. 学会等名 日本森林学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

カミキリムシに不妊化現象を引き起こす細菌を発見 今後の害虫防除資材としての開発に期待
<http://www.ffpri.affrc.go.jp/press/2022/20220224/index.html>

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
研究分担者	安佛 尚志 (Anbutsu Hisashi) (30392583)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員 (82626)	
研究分担者	高務 淳 (Takatsuka Jun) (80399378)	国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主 任研究員 等 (82105)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関