

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26850217

研究課題名(和文)アリの交尾繁殖生態と関連するウィルスの感染法および除去法の確立

研究課題名(英文) Infection or removal of virus related to reproductive system of ant

研究代表者

小山 哲史 (Koyama, Satoshi)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10549637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ヤマヨツボシオオアリにおいて高率に感染しているCamponotus yamaokai virusに関して、その宿主アリへの影響を解明することを最終目的として、そのために当該ウイルスへの感染個体と非感染個体の作出を試みた。そのために、薬剤投与、低温処理、高温処理、ウイルス注入、単独女王による巣の創設実験を行い、当該ウイルスに感染しているアリと感染していないアリを作成した。

研究成果の概要(英文)：I ultimately aim at revealing the function of Camponotus yamaokai virus to host ant, Camponotus yamaokai. In this study, I attempted to create Camponotus yamaokai ant with and without the virus. To do so, I performed various experiments, such as chemical administration, high and low temperature treatment, virus injection and forced nest foundation by single queen. Then, I successfully created ants with and without the virus.

研究分野：社会生物学

キーワード：二本鎖RNAウイルス

1. 研究開始当初の背景

社会性昆虫であるアリでは、多様な交尾繁殖様式が見られる。近年、ウイルスが宿主の形質と関連している例が複数の群類群で報告されており、そのようなアリの交尾繁殖様式と、ウイルス感染との間に関係性がみられる可能性がある。しかし、アリに感染するウイルスに関する知見は、いまだ十分に蓄積していない。そこで、永続的な多女王制を示し、分巢により繁殖するヤマヨツボシオオアリ (*Camponotus yamaokai*) と、ヤマヨツボシオオアリに高率で感染している二本鎖 RNA ウイルス *Camponotus yamaokai virus* をモデルとして、宿主アリとウイルスの関係性を明らかにすることを最終的な目的とし手研究を行っている。しかし、宿主アリとウイルスの関係性を明らかにするためには、同種のアリにおいて、ウイルス感染状況が異なる個体の行動を比較する必要がある。そこで本研究では、ウイルス非感染種のアリに対するウイルス接種・感染法、およびウイルス感染種に対するウイルス除去法を確立し、当該ウイルスの機能解明に用いるアリコロニーの作成を目指す。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、ウイルスの機能を解明し、宿主アリとウイルスの相互作用を明らかにすることである。そのために、同種のアリにおいてウイルス感染状況の異なる個体を作成し、比較する必要がある。そこで本研究では、ウイルス非感染種のアリに対するウイルス接種・感染法、およびウイルス感染種に対するウイルス除去法を確立することにより、同一種のアリにおけるウイルス感染個体とウイルス非感染個体の作出を目指した。

3. 研究の方法

(1)ウイルス感染・非感染個体、もしくはコロニーを作成するため、以下の実験を行った。

薬剤投与：当該ウイルスを治癒させる可能性のある薬剤として、シクロヘキシミド、グアニジン塩酸塩、クロラムフェニコールをアリに投与した。各試薬はシヨ糖液に希釈して投与した。薬剤は各3濃度(シクロヘキシミド:1-100 µg/ml; グアニジン塩酸塩:1.5-150 mM; クロラムフェニコール:1-100 µg/ml) 用いた。

高温処理：ヤマヨツボシオオアリのコロニーをインキュベーター内で種々の温度で飼育し、生存可能な温度を調査した後、その高温で一定期間飼育する

ことにより、ウイルスが除去されるかを検証した。

感染実験：ナワヨツボシオオアリ・ウメマツオオアリ・イトウオオアリのワーカーの腹部にウイルス液を注入する。ウイルス液は、ヤマヨツボシオオアリのワーカー3匹を凍結した後に、ミツバチの生理食塩水に入れて粉碎し、フィルターろ過することにより作成したウイルス液注入後、アリは3か月間飼育し、ウイルスへの感染の有無を確認した。

飼育実験：ヤマヨツボシオオアリのコロニーにおいて、当該ウイルスに感染していない個体がみられた。ウイルス感染率は、カーストによる差はみられなかった。当該ウイルスは、未交尾女王の卵細胞内から検出されており、卵を介した垂直感染が示唆されている。そこで、実験的に一匹の女王アリからコロニーを作成させる方法を確立し、コロニー創設後にウイルスの有無を調査する。それにより、ウイルス感染個体とウイルス非感染個体を作成した。

ウイルス感染の有無の確認は、*Camponotus yamaokai virus* の RdRp モチーフをプライマーとして用いたリアルタイム PCR 法により行った。

(2) ウイルスの感染状態を操作した場合、薬剤接種などの実験方法自体が、アリの行動に影響を及ぼす可能性があった。そこでその実験による影響を最小限に抑える方法として、次世代を作成し、作成した次世代を用いてウイルスの機能解析を行う方法がある。そこで、実験手法による影響を最小にする方法として、実験に用いたナワヨツボシオオアリ・ウメマツオオアリ・ヤマヨツボシオオアリの継代飼育法の開発を試みた。そのために、まず実験に用いた種のコロニーから女王を除去し、有翅女王とオスが生産されるかを確認した。次に、有翅女王とオスを実験的に交尾させる方法を検討した。

4. 研究成果

(1)

薬剤投与：各薬剤3濃度を、各3群に投与したところ、ほとんどの個体が死亡した。これは薬剤自体の毒性が宿主アリに影響したためであると考えられる。そのため、実験に用いた最低濃度で再度、薬剤投与実験を行った。3か月の薬剤投与後、ワーカーを用いて当該ウイルスの有無を確認したが、明確なウイルス量の消失はみられなかった。

高温処理：ヤマヨツボシオオアリを高

温条件下で飼育したところ、35 で一週間、生存可能であった。この温度は、自然条件下でも経験する温度であるため、この条件での飼育によるウイルス除去効果は可能性が低いと考えられたが、念のため、この条件で飼育を行った後、ワーカーにおける当該ウイルスの有無を確認したが、予想通り、明確なウイルス量の消失はみられなかった。

感染実験：3種のアリの腹部にウイルスを注入し、3か月後にリアルタイムPCR法によりウイルスの有無を確認したが、ウイルスへの感染は確認されなかった。

飼育実験：女王ア리를巢から取り出して新しい巢材を与え、そこに同巢のワーカーを一匹付けて、飼育を開始した。ワーカーは胸部背面にマークを付けた。この状態で飼育を数か月続け、この女王が産卵した個体が羽化した後、最初のワーカーを巢から除外した。その後、当該女王由来のワーカー数が十分に増えたところでウイルスの有無を確認した。その結果、作成した実験群により、ほぼ全てのワーカーからウイルスが検出される群と、全くウイルスが検出されない群がいることが判明した。

(2) まず、ナワヨツボシオオアリおよびウメマツオオアリのコロニーから女王を除去し、有翅女王とオスが生産されるかを確認した。採取したナワヨツボシオオアリおよびウメマツオオアリのコロニーから女王ア리를除去して飼育を継続したところ、多数の有翅女王とオスが生産されることが確認された。特にナワヨツボシオオアリを用いた場合には、オスアリが生産されるまでの期間は、25 で飼育した場合、約4週間から5か月程度であった。しかし、コロニーからワーカーのみを取り出して飼育し、ワーカー産卵によりオスアリの生産を試みたところ、ほとんどの場合、最初のオスアリ生産までに1年以上かかった。オスアリ生産までの期間に、このような大きな差がみられる原因は不明であるが、ブルードの有無や季節などが関連していると推測される。一方、ヤマヨツボシオオアリを用いて、巢から女王ア리를除去した場合、有翅女王とオスが生産されることは稀であった。佐藤(1990)では、ヤマヨツボシオオアリにおいて無女王群から有翅女王とオスが生産されたことが報告されており、ヤマヨツボシオオアリにおける有翅女王とオスの生産にも、季節や温度が影響する可能性が考えられる。

次に、ナワヨツボシオオアリ・ウメマツオオアリ・ヤマヨツボシオオアリにおいて、有翅女王とオスを実験的に交尾させる方法

を検討した。ナワヨツボシオオアリとウメマツオオアリは結婚飛行を行う一方、ヤマヨツボシオオアリでは巢内交尾を行うことが示唆されている。そこでまず、ヤマヨツボシオオアリを用いて、実験的に交尾させる方法を検討した。そのために、ヤマヨツボシオオアリの有翅女王とオスアリを一つのけプラスチックケースに入れ、交尾を行うかを観察した。その結果、実験を行ったペアのうち、約半数においてオスがメスに対して交尾試行を行い、そのうち約3分の1で交尾に成功した。

次にナワヨツボシオオアリおよびウメマツオオアリを用いて、実験室内で交尾させる方法を検討した。そのために、異なるコロニーから採取した有翅女王とオスを、同一ケージ内に入れ、交尾が起こるかを観察したが、ナワヨツボシオオアリ・ウメマツオオアリ共に、交尾行動は観察されなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2件)

Satoshi Koyama, Chihiro Sakai, Cathleen E. Thomas, Takuro Nunoura, Syun-ichi Urayama.

A new member of the family Totiviridae associated with arboreal ants (*Camponotus nipponicus*). Archives of Virology (2016) 161:2043–2045. DOI 10.1007/s00705-016-2876-x

Satoshi Koyama, Syun-ichi Urayama, Tsutomu Ohmatsu, Yukiko Sassa, Chihiro Sakai, Mamoru Takata, Shinya Hayashi, Makoto Nagai, Tetsuya Furuya, Hiromitsu Moriyama, Toshiyuki Satoh, Shin-ichi Ono and Testuya Mizutani.

Identification, characterization and full-length sequence analysis of a novel dsRNA virus isolated from the arboreal ant *Camponotus yamaokai*. Journal of General Virology (2015), 96, 1930–1937. DOI 10.1099/vir.0.000126

[学会発表](計 1件)

小山哲史 日本動物行動学会 多女王制オオアリに共生するウイルスは何をしている? 2014年

[図書](計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

該当なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小山 哲史 (KOYAMA, Satoshi)

東京農工大学大学院・農学研究院・准教授

研究者番号：10549637