

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04622

研究課題名(和文) 太平洋地域に出現したタイワンカブトムシ新規バイオタイプのウイルス抵抗性要因の探索

研究課題名(英文) Factors associated with occurrence of novel biotype of *Oryctes rhinoceros* resistant against nudiviruses

研究代表者

仲井 まどか (Nakai, Madoka)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60302907

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)：タイワンカブトムシ(別名サイカブトムシ：*Oryctes rhinoceros*)は、ココヤシやアブラヤシなどヤシ類の害虫である。本種の防除には、1970年代から1980年代にかけて天敵ウイルスを用いた防除が実施され、南太平洋のフィジーなどではヤシの被害を抑えることに成功した。しかし、2007年にグアム(米国)にウイルスが効かないハプロタイプ(遺伝子型の異なる同種の系統)が侵入したことが報告され、その後もこのGタイプがハワイ、ソロモン諸島、パプアニューギニアなどに分布を拡大している。本研究では、Gタイプの防除に使用可能なウイルス株の探索を目的として、パラオの個体群から天敵ウイルスを分離した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パラオのソンソロ州には、島民が天水のみで生活している離島が多数あり、これらの島々では、ココヤシが枯死することは、生命の危機を意味するという。タイワンカブトムシの分布拡大は、太平洋州の住民にとって死活問題と受け止められており、天敵を用いた防除の必要性が叫ばれている。本研究では、パラオのフェロモントラップで採集した成虫が病原力を持ったウイルスに感染していること、しかし、その病原力が従来の生物的防除で使用されている分離株に比べて低いことを示した。さらに、これら成虫の70%近くからウイルスDNAが検出されることから、垂致死感染(致死を引き起こさない感染)成虫同士がウイルスを伝播している可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Coconut Rhinoceros Beetle (*Oryctes rhinoceros*) is a pest of coconut palms and oil palms. Natural enemy of this species, nudivirus, was used to control this species in the 1970s and 1980s, and succeeded in reducing damage to palms in the South Pacific including Fiji. However, in 2007, it was reported that a haplotype (a strain of the same species with a different genotype), in which the virus is ineffective, invaded Guam (USA), and since then this G-type has been expanding its distribution to Palau, Hawaii, Solomon Islands, Papua New Guinea, and other countries. In this study, we isolated natural enemy viruses from Palau populations in order to search for virus strains that could be used to control the G-type.

研究分野：応用昆虫学

キーワード：タイワンカブトムシ サイカブト ヌディウイルス ヤシ 太平洋州

## 1. 研究開始当初の背景

ココヤシは、生命の木 (Tree of life) とよばれ熱帯地方の人々の生活を支えている。タイワンカブトムシ (サイカブトムシ: *Oryctes rhinoceros*) は、成虫がヤシの新芽を食害するため被害が大きい場合には樹を枯死させてしまう。もともとは南アジアや東南アジアに分布するが、1909年にスリランカからサモアに侵入して以来、複数回にわたり太平洋州の島々に侵入し、ココヤシやアブラヤシ等のヤシ類に甚大な被害をもたらした。ちなみに、日本には1921年に石垣島に侵入して以来、沖縄県のほぼすべての島に侵入している。この害虫の防除に天敵ウイルスである *Oryctes nudivirus* (二本鎖 DNA ウイルス: 以下 OrNV と略す) を用いた生物的防除 (生きた天敵をつかった害虫防除) が実施され成功をおさめた。ドイツが先導したこの国際的なプロジェクトにより、当時タイワンカブトムシ侵入地域でのヤシ類の被害はほとんどなくなった。しかし、2007年にグアムで新たに本種が侵入し、ココヤシに対する被害が甚大になった (図1)。グアムに侵入した個体群には、ミトコンドリアの遺伝子に他の地域の個体群にはない変異のあるため、このハプロタイプは G タイプ (グアムの頭文字) と呼ばれている。グアムでは、天敵ウイルスである OrNV を導入しても防除がうまくいかなかったことなどから、G タイプは、天敵ウイルスである OrNV に対して抵抗性であると報告された (Marshall, et al., 2017, J Invertebr. Pathol., 149, 127)。しかし、G タイプとその他のタイプ (S タイプなど) を比較したウイルス感受性試験などはおこなわれておらず、G タイプのウイルス感受性を含む生物学的特徴は明らかになっていない。



図1. タイワンカブトムシに食害されたココヤシ (2018年11月グアム大学構内で撮影)。

## 2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、G タイプのウイルス抵抗性の遺伝様式の解明であった。前述のように G タイプが、その他の S タイプ等と比べて OrNV に対してどのくらい抵抗性なのかはわかっていない。そこで、まずそれぞれの個体群の OrNV に対する感受性試験を行い、両系統のウイルス抵抗性比を解明することを目的とする。次に、G タイプと S タイプを交配させた個体群、この F1 世代に戻し交雑させた個体群の感受性試験を行うことにより遺伝様式を決定する計画であった。

本研究の第二の目的は、タイワンカブトムシからの共生微生物の検出であった。細胞内共生微生物のうち、*Wolbachia* ( $\alpha$ -プロテオバクテリア綱の細菌の一種) は、全昆虫種の 40% に感染しているとされている。また、近年、キイロショウジョウバエ等の研究で、共生微生物の感染により宿主昆虫が天敵ウイルスに対して抵抗性になる事例が見つかっている。しかし、タイワンカブトムシにどのようなが感染しているのか、これらの共生微生物がウイルス抵抗性に関わっているのか、については全く明らかにされていない。そこで、共生微生物の感染率とウイルス抵抗性との関連を明らかにすることを本研究の第二の目的であった。

さらに、グアムからの直行便もあり、距離にして約 1300 キロメートルにあるパラオでは、G タイプと S タイプの両方が生息することが報告されている (Marshall, et al., 2017)。このように、S タイプなど従来のハプロタイプが既に生息する地域に、G タイプが再侵入する事例も今後出てくる可能性がありその生態を調査する必要がある。そのため、本研究では、パラオにおけるタイワンカブトムシのハプロタイプと OrNV 有病率、さらには、パラオ個体群から分離した OrNV の性状解析を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 1) タイワンカブトムシ飼育方法の最適化

ウイルスを用いた生物検定法を確立するため、タイワンカブトムシの室内飼育方法の最適化を行った。まず日本国内のタイワンカブトムシ個体群を採集し、そのハプロタイプの決定を行った。奄美大島、沖縄本島、石垣島においてタイワンカブトムシ幼虫を採集しミトコンドリア領域の塩基配列を決定した。その結果、日本国内で採集した個体群はすべて G タイプであった。日本産タイワンカブトムシの室内飼育方法について、検討を行った。グアム個体群の輸入の準備として、飼育室の整備を行い、植物防疫所より輸入禁止品の輸入許可を得た。その後、グアムよりタイワンカブトムシを輸入し飼育法を検討した。

## 2) ウイルス増殖方法の検討

OrNV の増殖は、海外ではカブトムシ亜科の African Black Beetle (*Heteronychus arator*) 胚子由来の DSIR-Ha-1179 細胞が用いられている。しかし、この細胞が入手できないため、日本で入手可能なコガネムシ科昆虫由来の細胞株であるドウガネブイブイ (*Anomala cuprea*) の胚子由来の FRI-AnCu35 細胞 (Mitsuhashi, 2003, In Vitro Cell. Develop. Biol. - Animal, 39, 399) をウイルス増殖用の細胞として代用した。この細胞株は農研機構遺伝資源センター農業生物資源ジーンバンクより分与された後、東京農工大学で継代培養した。

## 3) ウイルスサンプルの入手

2018 年に AgResearch (ニュージーランド) で開催されたワークショップに参加し、今後の共同研究について打ち合わせした。その際に、ニュージーランドの AgResearch と MTA を締結し AgResearch で保存されていた Nudivirus 分離株を分与される運びとなった。また、パラオ個体群からのウイルス分離については、2017 年にパラオ共和国政府 (The Ministry of Natural Resources, Environment and Tourism) と東京農工大学が協定を結んで、パラオで捕獲された本種の死体より Nudivirus を分離した。

## 4) ウイルスの分離と同定

パラオから輸入したタイワンカブトムシ成虫の死体を磨砕し、ショ糖密度勾配超遠心分離により OrNV 粒子を分離した。これを日本産タイワンカブトムシ幼虫に接種し感染致死を確認した。感染虫体内におけるウイルス遺伝子の発現を RT-PCR で確認した。また、透過型電子顕微鏡観察によりウイルス感染虫の組織の超薄切片を作製しウイルス粒子の形態を観察した。

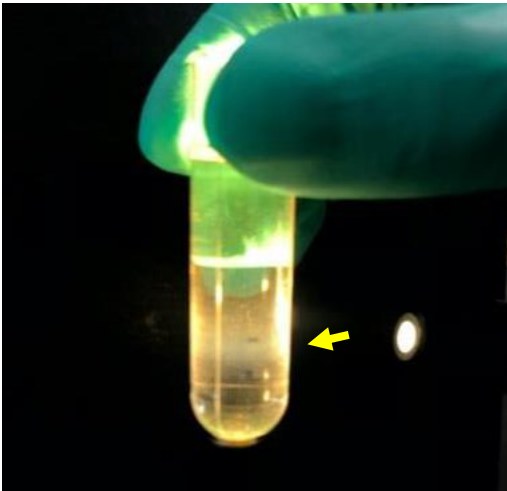


図2 ショ糖密度勾配超遠心分離により得られたウイルス粒子のバンド(矢印で示す)。

## 5) 生物検定

Nudivirus をタイワンカブトムシ幼虫個体に接種する方法として本研究では2齢幼虫に対する注射接種法を採用した。培養細胞において増殖させたウイルスを2齢幼虫に注射接種し、腐葉土内で飼育した。感染虫の体内で増殖するウイルス DNA を定量 PCR により測定した。また、ウイルス感染による致死時間を測定した。

## 6) OrNVのゲノム解析

パラオで捕獲された成虫個体より分離した OrNV を Palau1 株として全ゲノム解析を行った。比較対象として、生物的防除に汎用されている X2B 株とともに全ゲノム解析を行った。DNA ライブラリの調製は NexteraXT DNA Library Prep Kit (Illumina) を用いて行った。調製したライブラリを HiSeq2500 (Illumina 社) によりシーケンスを行った。OrNV Palau1 株、X2B 株の全ゲノム配列の決定

で得られた NGS データに対して unicycler (version 0.4.8) を用いてアセンブルを行い、各株のコンティグを作成した。得られたコンティグは blastx により、OrNVSI 株をデータベースとした相同性検索にかけた。その後コンティグを minimap2 (version 2.17) により上記のソロモン株配列にマッピングした。得られた SAM ファイルを BAM 形式に変換するために samtools (version 1.10) を用いた。この BAM ファイルを IGV (version 2.8.6) で配列として可視化した。Palau1 株の配列では contig 間の gap が 6ヶ所認められたため、特異的なプライマーを作製し PCR 増幅産物のダイレクトシーケンスにより配列情報を補足した。また、両株において生データのリードとアセンブルされたコンティグで明らかに一致しない 10~50 の塩基の挿入や欠失が見られた部位があったため、これらも上記と同様にダイレクトシーケンスにより配列情報を補足した。両株の contig と gap 配列の fasta ファイルを、cat コマンドを用いてそれぞれ一つのファイルにまとめた後に、再び minimap2 を用いてリファレンスゲノムにマッピングを行なった。得られた SAM ファイルを BAM ファイルに変換した後、IGV で配列を可視化し、アセンブル前の生データと照らし合わせ gap 部位や塩基の欠失などを確かめた。その後コンセンサス配列を得るために bcftools (version 1.10.2) を用いた。

## 7) タイワンカブトムシにおける共生細菌叢

グアム、パラオ、および沖縄産のタイワンカブトムシより DNA を抽出し、プロテオバクテ

リア叢を同定できるプライマーを用いて PCR により共生細菌叢の検出を行った。

#### 4. 研究成果

##### 1) タイワンカブトムシ飼育方法の最適化

- 1) 奄美大島、沖縄本島、石垣島においてタイワンカブトムシ幼虫を採集しバイオタイプの決定を行った。その結果、日本国内で採集した個体群はすべて G タイプであることが判明した。また、OrNV の遺伝子を検出するプライマーを用いて PCR を行ったところ、沖縄産およびグアム産のタイワンカブトムシからは OrNV の遺伝子が検出されなかったが、パラオ産からは OrNV の遺伝子が検出された。

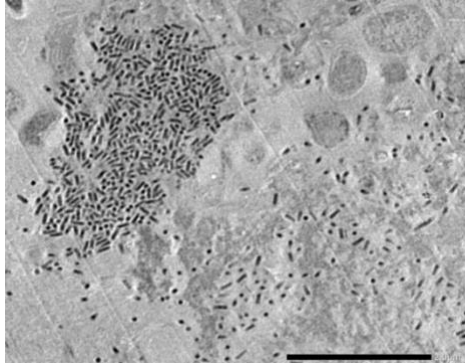


図3 Palau1 株を接種した日本産タイワンカブトムシ幼虫組織の透過型電子顕微鏡像。ウイルス粒子の増殖がみとめられた。バーは、2  $\mu$  m。

植物防疫所より輸入禁止品の輸入許可を得て、グアムより G タイプ個体群を輸入し飼育した。輸入個体は、順調に生育したが、成虫の体サイズが小さく、十分な次世代を得ることができなかった。また、グアム大学と連携して、アメリカ領サモアからグアム大学に S タイプを空輸し、グアム大学から東京農工大学に S タイプを輸入する計画であったが、2018 年および 2019 年にそれぞれ麻疹ウイルスと新型コロナウイルスの感染拡大のため同国に入国ができなかった。そのため、S タイプの輸入ができず、第一の目的は達成できなかった。一方、日本産タイワンカブトムシは順調に飼育できたため、以降の実験には日本産タイワンカブトムシを使用した。

##### 2) ウイルス増殖方法の検討

OrNV のウイルス粒子を FRI-AnCu35 細胞に接種したところ接種後 5 日目から細胞病変効果が確認できた。また定量 PCR によりウイルス DNA の増殖を確認した。

OrNV が、FRI-AnCu35 細胞に感染することがはじめて確認できた。FRI-AnCu35 細胞は、OrNV の増殖等の研究に使用できることがわかったが、この細胞は、ドウガネブイブイ由来であるため、ドウガネブイブイなどコガネム科の昆虫に対する感受性を調査することが必要である。

##### 3) ウイルスの分離と宿主昆虫に与える影響

パラオから輸入したタイワンカブトムシ成虫について PCR によりウイルス DNA を検出したところ、その 75% 以上から OrNV の遺伝子が検出された。その死体からショ糖密度勾配超遠心分離により OrNV 粒子を分離した (図 2)。このウイルス株を Palau1 株として、日本産タイワンカブトムシ幼虫を用いてウイルス DNA の増殖と致死速度を調査した。接種個体の組織を電子顕微鏡により観察したところ nudivirus のウイルス粒子が確認された (図 3)。比較対象とした X2B 株にくらべて、Palau1 株は、ウイルス DNA の増殖量が少なく、致死時間も有意に長かった。

##### 4) OrNV のゲノム解析

Palau1 株 (パラオ 由来) は、X2B 株 (フィリピン由来) に非常に近縁であった。また、両者は、Solomon Island 株 (ソロモン諸島由来) と LiboV 株 (インドネシア由来) とも近縁であったが、Ma07 株 (マレーシア由来) にくらべて 1.6kp 短かった。X2B 株と Palau1 株の Open Reading Frame を比較したが、殺虫スピードやウイルス増殖量の差に関する変異は見つからなかった。

##### 5) タイワンカブトムシにおける共生細菌叢

沖縄・グアム・パラオで採集された本種に対してプロテオバクテリア層を同定できるプライマーを用いて PCR により共生細菌層を調査した。その結果、*Wolbachia* や *Rickettsia* は同定されなかった。共生細菌としては、*Clostridium cellulosi* (セルロース系バイオマス分解細菌) や植物由来の多糖類を短鎖脂肪酸およびエタノールに発酵させる *Clostridium* 目に属する *Lachnospiraceae bacterium* が検出された。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Robert L. Harrison, Elisabeth A. Herniou, Annie Bezier, Johannes A. Jehle, John P. Burand, David A. Theilmann, Peter J. Krell, Monique M. van Oers, Madoka Nakai and ICTV Report Consortium	4. 巻 101
2. 論文標題 ICTV Virus Taxonomy Profile: Nudiviridae	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of General Virology	6. 最初と最後の頁 3-4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jgv.0.001381	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 該当する

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 4件/うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Shunsuke Tanaka, Hiroshi Arai, Christopher Kitalong, Sean Marshall, Madoka Nakai
2. 発表標題 Overt nudivirus infections confirmed from CRB-G adults in Palau: Virus isolation and characterization of nudivirus
3. 学会等名 CRB-G Action Group Webina (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中俊祐, 新井大, Christopher Kitalong, Sean Marshall, 井上真紀, 仲井まどか
2. 発表標題 パラオ産台湾カブトムシからPCRで検出されたヌディウイルスは顕性感染だった
3. 学会等名 第65回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shunsuke Tanaka, Hiroshi Arai, Christopher Kitalong, Sean Marshall, Madoka Nakai
2. 発表標題 Overt nudivirus infections confirmed from CRB-G adults in Palau: Virus isolation and characterization of nudivirus
3. 学会等名 CRB-G Action Group Webinar (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tanaka, S., Kitalong, C., Inoue, N.M., Nakai, M.
2. 発表標題 Biotype and nudivirus prevalence of <i>Oryctes rhinoceros</i> in Palau
3. 学会等名 Society for invertebrate pathology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中俊祐, 井上真紀, 仲井まどか
2. 発表標題 <i>Oryctes rhinoceros</i> nudivirus/パラオ株のゲノム解析および病理学的特性の解明
3. 学会等名 第64回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中俊祐, 新井大, 仲井まどか
2. 発表標題 太平洋地域に出現したタイワンカブトムシ 新規バイオタイプのウイルス抵抗性要因の探索
3. 学会等名 2018 (平成30) 年度 海外学術調査フォーラムプログラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Madoka Nakai
2. 発表標題 <i>Oryctes rhinoceros</i> in Japan and its biotype
3. 学会等名 51th annual meeting of Society for Invertebrate Pathology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Christopher Kitalong, Justin Omak Ramarui, Jason Ngiramengior, Balang Skey, Nelson Masang, Shizu Watanabe, Michael Melzer, Madoka Nakai, Joel Miles
2. 発表標題 CRB damage and resistance assessment in the Palau Archipelago
3. 学会等名 51th annual meeting of Society for Invertebrate Pathology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中 俊祐, 新井 大, 井上 真紀, 仲井 まどか
2. 発表標題 日本に生息する台湾カブトムシのバイオタイプとウイルス有病率の調査
3. 学会等名 第13回昆虫病理研究会シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中俊祐, 新井 大, Christopher Kitalong, 井上真紀, 仲井まどか
2. 発表標題 パラオの台湾カブトムシのバイオタイプとウイルス有病率
3. 学会等名 第63回日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Madoka Nakai
2. 発表標題 Oryctes rhinoceros in Japan and its biotype
3. 学会等名 16th Pacific Entomology Conference featuring the Hawaii Botanical Forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Madoka Nakai
2. 発表標題 Ecology of insect viruses: how viruses adapt to their insect host population
3. 学会等名 50th of Annual Meeting and Golden Jubilee Celebration of the Society for Invertebrate Pathology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>国際研究集会のお知らせ (太平洋地域に出現した台湾カブトムシ新規バイオタイプの現状と対策)  <a href="https://www.tuat.ac.jp/event/general/20171002_01.html">https://www.tuat.ac.jp/event/general/20171002_01.html</a></p>
---

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	浅野 眞一郎  (Asano Shinichiro)  (60222585)	北海道大学・農学研究院・教授    (10101)	

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2件

国際研究集会 太平洋地域に出現した台湾カブトムシ新規バイオタイプの現状と対策	開催年 2017年～2017年
国際研究集会 Oryctes nudivirus - what we know, and what we don't know	開催年 2018年～2018年



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			
米国	グアム大学	アメリカ農務省		
パラオ	パラオコミュニティカレッジ			
ニュージーランド	AgResearch			