

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14606

研究課題名（和文）宿主操作の神経メカニズムから生態系間資源流の時空間変動を解明する

研究課題名（英文）Predicting spatio-/temporal-variation of parasite-mediated energy flow by revealing neural mechanisms of host manipulation by nematomorph parasites

研究代表者

佐藤 拓哉（Sato, Takuya）

神戸大学・理学研究科・准教授

研究者番号：30456743

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）：ハリガネムシ類（寄生生物）が陸生昆虫（終宿主）の入水行動を生起して河川に飛び込ませると、終宿主がサケ科魚類の極めて重要な餌資源になる。本研究では、宿主操作の神経メカニズムを明らかにすることで、上記の餌資源流が生じる時間と場所を理解・予測することを目指した。その結果、成熟したハリガネムシ類に感染したカマキリ（宿主）では、活動量の上昇や正の走光性がみられた。また、そのような行動変化に関与すると考えられる、いくつかの生体アミン類の脳内での上昇を確認することができた。

研究成果の概要（英文）：Nematomorph parasites indirectly strengthen energy flow through ecosystems via behavioral manipulation of their terrestrial hosts. However, neural mechanisms underlying this behavioral manipulation by the nematomorphs have not yet been clarified, which is making us difficult to predict the temporal-/spatial- variations of the parasite-mediated energy flow. To bridge the gaps between ecological and neuro-ethological knowledge about host manipulations, we examined behavior and brain biogenic monoamine levels in two Mantodea species parasitized by the nematomorphs to elucidate the neural mechanisms of the nematomorphs' host manipulation. Overall, the locomotion activities of mantis harboring mature nematomorphs tended to be high irrespective of time of the day. In the parasitized mantis, dopamine and octopamine levels in the brain tended to be higher than those in the un-parasitized one, which might be one of the neural mechanisms of the behavioral manipulation by the nematomorphs.

研究分野：生態学

キーワード：宿主操作 神経メカニズム 系外資源流 ハリガネムシ

1. 研究開始当初の背景

寄生者(ハリガネムシ類)が、終宿主(陸生昆虫)の行動を操作して河川に飛び込ませると、それがサケ科魚類のエサとなることで陸上生態系から河川生態系へのエネルギー流が生じ(Parasite Mediated Energy Flow; PMEUF)、河川の群集構造や生態系機能を大きく改変される。

PMEUF (= 生態系間資源流)は、特定の日・時間や場所に多く(佐藤 未発表データ)、そのような時空間変動は消費者の摂餌行動の改変を介して生物群集全体に影響する。PMEUFの時空間変動は、自然環境下でハリガネムシ類がいつ、どのような場所で宿主の入水行動を生起するかに強く規定される。したがって、PMEUFの時空間変動を予測するためには、宿主操作の至近要因を解明する必要がある。

先行研究は、宿主脳内のタンパク質発現の網羅的解析や行動実験に基づき、ハリガネムシ類が宿主の活動パターンを改変して水辺遭遇確率を高めた後、光応答を改変することで入水行動を生起すると指摘している。しかし、寄生によって発現パターンが変化するタンパク質については、機能解析や発現調節の理解が進んでおらず、それらと活動パターン・光応答の改変との因果関係は不明である。すなわち、宿主の内的状態(神経メカニズム)を理解できていないため、宿主の入水行動が生起される時間と場所(=PMEUFの時空間変動)を論理的に予測することができない。

2. 研究の目的

本研究では、分野横断的な研究アプローチで、宿主操作の神経メカニズムの解明からPMEUFの時空間変動を予測可能にすることを目的とした。具体的には、(1)宿主操作の要となる神経メカニズムの解明、(2)宿主行動のモデル予測、(3)モデル予測の野外検証を行い、「宿主操作が生起される時間と場所=PMEUFの時空間変動」を解明する。個体レベルで生起される宿主操作の神経メカニズムから生態系を駆動するPMEUFの時空間変動の理解に至ることで、生物学的階層を越えた生態系プロセスの解明に迫ることが究極目標である。

3. 研究の方法

(1) 実験動物の準備

Tenodera angustipennis(チョウセンカマキリ)

2015年の10月に成虫を、2016年の8月に幼虫を、大阪府守口市内の農地で採集した。採集個体は研究室のインキュベータ[25-30℃, L:D=12:12(明期:06:00-18:00,

156 lux)]で個別飼育し、2-3日に1度、餌としてミルワームを与え、霧吹きで水分を与えた。実験には成虫のみを用い、研究室内で羽化した個体については羽化(最終脱皮)からの日齢を記録した。

Hierodula patellifera(ハラビロカマキリ)

実験室内で卵鞘から孵化させ、成虫まで飼育した個体を用いた。若齢幼虫から個別飼育して餌としてショウジョウバエを与え、5-6齢幼虫からは上述のチョウセンカマキリと同様の条件下で飼育した。

4-7齢の時期に、一部の個体に、*Chordodes*属ハリガネムシのシストを与え、人工的に寄生させた。シストは実験室で宿主から脱出したハリガネムシから得た卵(*Chordodes formosanus*)、もしくは山口県豊田町の河川で採集した卵(*Chordodes sp.*)を、神戸大学理学研究科の圃場で採集したサカマキガイに与えて作成した。*Chordodes*属の卵塊を与えて10-14日後に、サカマキガイを解剖して体内を顕微鏡で確認し、シストが確認できた個体の肉片をカマキリに与えた。コントロール(非感染)群のカマキリには、ハリガネムシシストが感染していないサカマキガイの肉片を与えた。

(2) 神経メカニズムの解明

歩行量実験

行動実験用ケージ[22-27℃, L:D=12:12(明期:06:00-18:00, 121 lux)]に複数設置したアリーナ(図1)でカマキリを個別飼育して、個々の活動を頭上から赤外線対応小型カメラ(HCIR-41F250A/FC, HOGAinc.)で継続的に撮影した。撮影は1日6回(2, 6, 10, 14, 18, 22時)1時間ずつ、1日おきに行った。18-6時の暗期の撮影には赤外線ライト(DC12-140-10M, HOGAinc.)を使用した。カマキリがアミン測定用にサンプリングされるか、自然死するか、もしくはハリガネムシがカマキリから脱出した時点で撮影を終了した。

得られた動画については、個体追跡ソフト(K-track ver.1.0, <http://software.incf.org/software/the-tracking-software-k-track>)を用いて、1fps(チョウセンカマキリ)もしくは8fps(ハラビロカマキリ)の動画から個体のピクセル座標を抽出した。抽出した座標からフレームごとの移動量を求め、その総和を観察時間中の総移動距離とした。その際、追跡に伴う「ぶれ」による誤差を軽減するため、フレームごとの移動量が1cm(チョウセンカマキリ:3 pixel、ハラビロカマキリ:8 pixel)以下だった場合には移動量0とした。

個体追跡ソフトによる解析が困難な一部のデータについては、0.5fpsの連続画像を用いて、自作のプログラムでカマキリ胸部のピクセル座標を取得し、上記と同様に観察時間中の総移動距離を求めた。

野外採集したカマキリと人工寄生させたカマキリではハリガネムシの寄生数に大きな差が見られた。野外採集個体の寄生数は平均して 1.7 ± 0.3 匹 (N=13) だったのに対し、人工寄生が成功した個体の寄生数は 4.1 ± 1.4 匹 (N=7) であり、人工寄生が失敗してハリガネムシの成熟前に死亡した個体も含めると 18 ± 2.6 匹 (N=46) であった (Table 2 参照)。これらをふまえて、解析では実験個体を非感染個体、ハリガネムシが成熟する前に死亡した個体 (Immature)、ハリガネムシが成熟して宿主から脱出した個体のうち 5 匹以上に寄生されていた個体 (自然状態ではほとんど見られない多重寄生個体 = Large) と 2 匹以下に寄生されていた個体 (自然状態での寄生数に近い個体 = Small) の 4 群に分類して比較した。

まず、算出した 1 時間の歩行量を昼 (明期: 6, 10, 14 時) と夜 (暗期: 2, 18, 22 時) のデータに分け、個体ごとの平均的な歩行量のばらつきを考慮できるように、各個体をランダム変数とする一般化線形混合モデル (GLMM) で解析を行った。このとき応答変数には歩行量を、その分布型にはガンマ分布を用い、説明変数には各分類群、昼夜の差、羽化からの週齢およびそれらの相互作用を用いた。

さらに、宿主操作の影響が強く表れると予想される脱出直前の歩行量に注目するために、それぞれの個体のデータから、ハリガネムシが脱出または宿主が死亡する直前の 1 週間のデータと羽化後 8-14 日の 1 週間のデータをそれぞれ抽出して比較を行った。前者を last week、後者を week2 とし、last week の平均歩行量を week2 の平均歩行量で基準化して増減率を調べた。week2、last week それぞれにおいて、応答変数を歩行量、説明変数を各分類群、昼夜の差として GLMM で解析を行った。

生体アミン分析

2 種のカマキリそれぞれについて、ハリガネムシの感染の有無とハリガネムシの成熟状態と関連した脳内生体アミンの発現量について検証した。

Tenodera angustipennis

野外で採集したチョウセンカマキリの成虫は、サンプリング後に腹部を解剖して、寄生の有無とハリガネムシの成熟状態を確認した。解剖の結果から、非感染個体 (unparasitized : U)、未成熟なハリガネムシによる被寄生個体 (parasitized-immature : PI)、成熟したハリガネムシによる被寄生個体 (parasitized-mature : PM) の 3 つに分類した。なお、実験室で羽化させた 2016 年の個体に関しては、以下のハラビロカマキリと同様にサンプリングを分類した。

Hierodula patellifera

被寄生個体、非感染個体ともに、一部は羽化から 5 日以内にサンプリングを行い、それぞれを、未成熟なハリガネムシが寄生している状態 (parasitized-immature : PI) と、そのコントロール

(unparasitized-immature : UI) とした。宿主内のハリガネムシの成熟状態を厳密に評価する方法について、腹部に寄生しているハリガネムシが既に成熟している場合、カマキリの腹部先端にハリガネムシの頭部を目視で確認できる。この状態のカマキリの腹部を水につけると、ハリガネムシが腹部先端から脱出するのに対して、ハリガネムシがまだ成熟していない場合には、頭部は確認できず、水につけてもハリガネムシは出てこなかった。したがって、本研究では腹部先端にハリガネムシの頭部が確認できる状態を、成熟したハリガネムシが寄生し宿主を操作している状態 (parasitized-mature : PM) とみなし、頭部が確認された以降にサンプリングを行った。また、ハラビロカマキリにおいて、ハリガネムシの成熟はカマキリの羽化後 30-46 日にかけて確認できる場合が多いことから (Chiu, Ming-Chung 未発表データ)、羽化後 30 日以降にサンプリングした非感染個体を PM のコントロール

(unparasitized-mature : UM) とした。

脳内生体アミン量の日周変動の影響を取り除くため、カマキリの行動変化が顕著に見られると予想される 12-14 時に限定してサンプリングを行った。

実験に先立ってカマキリの腹部を水につけ、成熟したハリガネムシが脱出するかどうかを確認した。その後、頭部を液体窒素につけ急速冷凍してからコオロギリンガー溶液中で解剖し、脳サンプルを摘出した。内部標準として 3,4-ジヒドロキシベンジルアミン (5 μ g) (DHBA, SIGMA, St Louis, MO, USA) を含む過塩素酸 (0.1M, 50 μ l) を加えてホモジナイズした後、遠心分離し (0, 15000 回転, 30 分間)、その上清を分析サンプルとして用いた。

得られたサンプルは高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて分析し、得られたデータは専用の解析ソフト (PowerChrom ver. 2.5, eDAQ) で解析して、主要な生体アミンの含有量 (pmol/brain) を求めた。

それぞれの生体アミンについて、応答変数を各アミン含有量、説明変数を宿主の性別、寄生の有無 (U/P)、成長状態 (I/M) およびそれらの交互作用とする一般化線形モデル (GLM) で解析を行った。

(3) モデル予測の野外検証

ハリガネムシに感染したカマキリの時期特異的な活動量の変化が野外における入水行動と対応しているかを検証するために、神戸大学大学院農学研究科附属食資源教育研

究センターの圃場において、2.7 m × 11 m のグリーンハウスを建てた(図3)。グリーンハウスの中には、水面からの反射光の異なる(遮光なし vs. 80%遮光) 2条件の水辺をそれぞれ2か所ずつ造成した。それぞれの水辺には防水インターバルカメラを設置して、1分間隔で撮影を継続することで、ハリガネムシに感染したカマキリがいつ、どの水辺に入水行動を行ったかを評価できるようにした。

2016年10月に、野外で採集した感染個体と思われるチョウセンカマキリ(12個体)とハラビロカマキリ(3個体)の計15個体をグリーンハウス内に放逐し、その後11月下旬まで、定期的にカメラのデータ回収と水辺の確認を行った。

4. 研究成果

(1) 人工感染系の確立

本研究プロジェクトを通して、ハリガネムシ(*Chordodes* sp.)の室内人工感染系を概ね確立することができた。しかしながら、ハリガネムシのシストを与えたハラビロカマキリは、体内のハリガネムシが未成熟な段階で死亡するものが多く、寄生が成功してハリガネムシが成熟するまでカマキリが生存した確率は2-7%に留まった。

野外において、被寄生個体の平均ハリガネムシ寄生数はチョウセンカマキリで 1.6 ± 0.2 匹(N=39)、ハラビロカマキリで 1.7 ± 0.3 匹(N=13)であったのに対し、ハリガネムシが成熟するまで生存した個体における平均ハリガネムシ寄生数は1個体あたり 4.1 ± 1.4 匹であり、さらにハリガネムシが成熟する前に死亡した個体の平均寄生数は 20.5 ± 2.9 匹であった。

このことから、室内人工感染系をより効率よく実施するためには、感染強度を調整する必要があることが強く示唆された。

(2) 神経メカニズムの解明

感染と関連した歩行量の時間変化

いずれのカマキリ種においても、非感染個体は、明期に歩行量が少なく、暗期に歩行量が増えるという明瞭な日周リズムを示した。一方、被感染個体では、ハリガネムシの寄生数によって歩行量に差が見られた。immatureでは、死亡するまでは非感染個体と同程度の活動量と日周リズムを示したのに対し、largeはハリガネムシが脱出するまで一貫して低い歩行量を示した。smallは、largeと同様に非感染個体と比べると有意に歩行量が少なかったが、ハリガネムシが脱出する直前の1週間には、歩行量が増加傾向を示した。そこで、last weekでの歩行量の増加率を個体ごとに確認するため、羽化後8-14日

(week2)の平均歩行量を1としたときのlast weekの平均歩行量を比較したところ、非感染個体とlargeでは、後者の歩行量が4割程度

に減少したのに対し、smallでは歩行量が約7倍に増加していた。

これらの結果をふまえ、非感染個体、small、largeの3カテゴリのlast weekの歩行量を比較してみると、smallでは明期における歩行量が非感染個体よりも高く、それまでに見られた明期に少なく暗期に多いという歩行リズムが不明瞭になることが示唆された。week2とlast weekそれぞれの歩行量をGLMMで解析すると、week2では昼夜の差のみが歩行量に影響していたのに対し、last weekでは昼夜の差と感染のカテゴリに交互作用が見られた。このことから、非感染個体は明期で少なく暗期で多い歩行量の日周リズムをもつが、smallでは明暗に関わらず歩行量が高く維持され、largeでは明暗に関わらず歩行量が顕著に少なくなることが明らかとなった。

感染と関連した脳内生体アミン量の変化

非感染、未成熟のハリガネムシに感染、および成熟したハリガネムシに感染したチョウセンカマキリの脳内の生体アミン含有量を分析・群間比較した。その結果、オクトパミンについてはハリガネムシの成熟状態に関わらず感染群で高い傾向が認められた。一方、ドーパミンは成熟状態のハリガネムシ類に感染した群で、他の群の値よりも高い傾向が認められ、活動量上昇に関わる可能性が示唆された。

(3) モデル予測の野外検証

グリーンハウス内に放逐したハリガネムシに被感染のカマキリについては、実験期間中に、造成した水辺に入水した個体が確認できなかった。今後、行動操作の神経メカニズムを光応答も含めてさらに詳細に検証することで、野外での入水行動に直接的に関わる仕組みを理解する必要があると考えられる。

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0件)

[学会発表](計4件)

佐藤拓哉、森と川をつなぐ細い糸：寄生虫を介した生物たちの多様なつながり、第64回日本生態学会、2017年3月18日、早稲田大学(東京都・新宿区)(高校生ジュニア生態学、招待講演)

Takuya Sato, The effects of temporally variable resource subsidies on stream ecosystems: Looking beyond the Nakano's legacy for stream-forest

linkages、第 64 回日本生態学会、2017 年 3 月 15 日、早稲田大学(東京都・新宿区)(国際シンポジウム、招待講演)

佐藤拓哉、自然生態系の中の病原生物：宿主操作が駆動するエネルギー流の意義と維持機構、第一回エコエピワークショップ、2016 年 12 月 26 日、JR 博多シティー(福岡県・福岡)(招待講演)

Kimura, F., Aonuma, H., Sato, T. & Sakura, M. Changes in biogenic amine levels and locomotion activities in the praying mantids *Tenodula angustipennis* and *Hierodula periffella* caused by the parasitic horsehair worm *Chordodes* sp. 22nd International Congress of Zoology/ 87th Meeting of the Zoological Society of Japan, November, 2016, Okinawa・Naha.

〔図書〕(計 2 件)

佐藤拓哉・鏡味麻衣子、共立出版、病原生物と宿主の種間相互作用。シリーズ現代の生態学 6。感染症の生態学、2016、380(73-86)

鏡味麻衣子・佐藤拓哉、共立出版、病原生物の食物網・物質循環における機能。シリーズ現代の生態学 6。感染症の生態学、2016、380(87-99)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.edu.kobe-u.ac.jp/fsci-satolab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 拓哉 (Sato, Takuya)
神戸大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：30456743

(2) 研究分担者

佐倉 緑 (Sakura, Midori)
神戸大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：60421989

(3) 研究分担者

山崎 将紀 (Yamasaki, Masanori)
神戸大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号：00432550

(4) 研究分担者

久保 拓弥 (Kubo, Takuya)
北海道大学・地球環境科学研究院・助教

研究者番号：80344498

(5) 研究協力者

青沼 仁志 (Aonuma, Hitoshi)
北海道大学・電子科学研究所・准教授
研究者番号：20333643