

令和元年6月14日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04944

研究課題名(和文) 寄生細菌“ボルバキア”によって引き起こされるピロウドカミキリの生殖攪乱現象の解明

研究課題名(英文) Elucidation of reproductive manipulation caused by Wolbachia in *Acalolepta fraudatrix*

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) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：ボルバキアは主に昆虫類の細胞内に寄生する細菌で、宿主に生殖異常を引き起こすことで知られている。本研究では、ピロウドカミキリに感染しているボルバキアが宿主に対しどのような生殖操作を行うのかを明らかにするため、研究を実施した。ボルバキアに感染しているピロウドカミキリ(感染系統)と感染していないピロウドカミキリ(非感染系統)を用いて、系統内・系統間で交配実験を行い、卵の孵化率を調査した。その結果、感染雄と非感染雌の組合せでは卵が全く孵化しないことが明らかになったことから、ボルバキアは宿主であるピロウドカミキリに対し、いわゆる「細胞質不和合現象(子孫をできなくする現象)」を引き起こすことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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、衛生害虫や農業害虫の分野を中心に生物的防除資材としての利用も検討されるなど、基礎研究だけでなく応用的な分野でも脚光を浴びている。本研究により、森林性昆虫であるピロウドカミキリの体内から、宿主に子孫を作らせなくする、いわゆる細胞質不和合を引き起こすボルバキアが存在が検出された。これによって、今後、森林防疫の分野でもボルバキアを利用した防除技術開発の進展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Wolbachia are a group of rickettsial endosymbiotic bacteria, they are capable of manipulating host reproduction. The purpose of this study is to elucidate the type of reproductive alteration caused by Wolbachia in *Acalolepta fraudatrix*. Mating experiment was performed using adults of *Acalolepta fraudatrix* infected with Wolbachia (infected strain) and those not infected with Wolbachia (uninfected strain), and egg hatching rate was investigated. Although three combinations of males and females (infected males x infected females, uninfected males x uninfected females, and uninfected males x infected females) produced offspring normally, the combination of infected males and uninfected females produced no offspring. Namely, it was clarified that Wolbachia in *Acalolepta fraudatrix* caused “cytoplasmic incompatibility” to the host.

研究分野：森林保護学、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 生殖操作 細胞質不和合

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 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、全昆虫種の約 20%がこの細菌に感染していると考えられている。この細菌の最大の特徴は、宿主昆虫に生殖異常をもたらすことにある。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=子孫数が半減する)、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。

マツノマダラカミキリはマツ材線虫病の病原体であるマツノザイセンチュウを媒介する森林害虫である。既往の研究により、マツノマダラカミキリには、ボルバキアは感染していないものの、マツノマダラカミキリのゲノム上にボルバキアの遺伝子が大規模に転移していることが明らかになっている。この事実は、マツノマダラカミキリは過去にボルバキアに感染していた時代があることを意味している。

その一方で、我々の研究により、マツノマダラカミキリと同様にマツ類を宿主とするビロウドカミキリ(写真1)にはボルバキアが感染していることが示唆されていた。



写真1 ビロウドカミキリ

2. 研究の目的

このように、マツノマダラカミキリは、体内にボルバキアを保持していた過去を持つことから、比較的ボルバキアを受け入れやすい体質であると推測できる。したがって、もし、このビロウドカミキリに感染しているボルバキアが、宿主に対して子孫を作らせなくするような生殖異常、すなわち細胞質不和合を引き起こすのであれば、衛生害虫や農業害虫と同様、このボルバキアをマツノマダラカミキリに導入することで生物的防除資材として利用できるかもしれない。このような発想から、本研究では、(1)ビロウドカミキリにボルバキアが感染していることを Fluorescent in situ hybridization (FISH)解析により視覚的に示すこと、(2)ビロウドカミキリに感染しているボルバキアを人為的に除去する方法を開発すること、そして(3)ボルバキアが宿主であるビロウドカミキリにどのような生殖異常を引き起こしているのか明らかにすること、の3点に焦点を絞り研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) FISH 解析によるビロウドカミキリに感染しているボルバキアの可視化：

ビロウドカミキリ雌成虫を解剖し、体内から卵巣を摘出した。それらの卵巣を固定液で固定した後切片を作成し、ボルバキアの 16S rRNA に特異的にハイブリダイズするプローブと結合させ、蛍光顕微鏡下で卵巣内のボルバキアの感染状況を観察した。

(2) ビロウドカミキリからボルバキアを除去する手法の確立：

ボルバキアは細菌であることから、抗生物質により死滅させることができる。本研究では、ビロウドカミキリの孵化幼虫を抗生物質(テトラサイクリン)入りの人工飼料で飼育することで、体内のボルバキアを除去する方法を試みた。野外でボルバキアに感染しているビロウドカミキリ成虫を採集し、それらを室内で交配させて次世代の孵化幼虫を得た。それらの孵化幼虫に抗生物質濃度の異なる3種類の人工飼料(抗生物質濃度0.1%、0.5%、1.0%)を与え、成虫になるまで発育させた。それらの成虫から精巣あるいは卵巣を取り出し、DNA抽出を行った後、ボルバキアの診断PCRによってボルバキア感染の有無を調査した。

(3) ボルバキアがビロウドカミキリの生殖機能に与える影響の解明

本研究では、ボルバキアがビロウドカミキリに対し、細胞質不和合、すなわち子孫を作らせ

なくする異常を引き起こすかどうかを明らかにするための実験を行った。ボルバキアに感染しているピロウドカミキリ成虫（感染系統）と、ボルバキアに感染していないピロウドカミキリ成虫（非感染系統）を用いて、系統内および系統間で交配させた。それらの交配実験で得られた卵から孵化した幼虫の割合を、親の組合せ間で比較することによって、細胞質不和合の有無を検証した。

4．研究成果

(1) ピロウドカミキリの卵巣を用いた FISH 解析の結果、卵巣内にはボルバキアの存在を示す蛍光シグナルが高密度で観察された。本実験では、DNA ではなく RNA にハイブリダイズするプローブを用いていることから、マツノマダラカミキリで見られたような、単なるボルバキア遺伝子の水平転移という現象ではなく、生きた細菌としてのボルバキアがピロウドカミキリに確実に感染していることが確認された。また、バクテリアユニバーサルプローブを用いての FISH 解析も行ったところ、このプローブによるシグナルと、ボルバキアプローブによるシグナルの位置が完全に一致したことから、ピロウドカミキリの卵巣には、ボルバキア以外のバクテリアは感染していないことも示された。

(2) ボルバキアに感染しているピロウドカミキリ孵化幼虫を 0.1%濃度の人工飼料で飼育し、成虫になるまで発育させた場合、得られた成虫のうち 38%がボルバキアフリーとなった。また、0.5%濃度の人工飼料で飼育した場合は、75%の成虫が、そして、1.0%の人工飼料で飼育した場合は、100%の成虫（羽化した成虫のすべて）がボルバキアを保持していなかった。このことから、ピロウドカミキリ体内のボルバキアを除去するに当たり、テトラサイクリンは有効であること、また、孵化幼虫に 1.0%以上の濃度のテトラサイクリン入り人工飼料を与えることによって、ボルバキアを体内から排除した成虫が得られることが示された。

(3) ボルバキア感染系統と非感染系統の 2 つ系統を用いて、4 タイプの交配の組み合わせ（組合せ：感染系統 × 感染系統、組合せ：非感染系統 × 非感染系統、組合せ：非感染系統 × 感染系統、組合せ：感染系統 × 非感染系統）で卵の孵化率を調査した。その結果、組合せ、の 3 タイプでは卵の孵化率がおよそ 60%前後だったのに対し、組合せの孵化率は 0%であった。この結果から、ピロウドカミキリに感染しているボルバキアは、宿主であるピロウドカミキリに対し、いわゆる「細胞質不和合」を引き起こすことが明らかとなった。また、この不和合現象が見られた組合せでは、200 個以上もの卵を採集したにもかかわらず、1 つも卵が孵化しなかったことから、その強度は非常に強いと推測された。

5．主な発表論文等

〔学会発表〕(計 5 件)

相川拓也・前原紀敏・升屋勇人・中村克典・安佛尚志．ピロウドカミキリに感染しているボルバキアが引き起こす細胞質不和合．第 130 回日本森林学会大会．2019 年 3 月 22 日．新潟コンベンションセンター「朱鷺メッセ」

小澤壮太・前原紀敏・相川拓也・升屋勇人・中村克典．マツノザイセンチュウ近縁種 *Bursaphelenchus doui* の寄生型成虫はカミキリムシに寄生するのか？第 130 回日本森林学会大会．2019 年 3 月 22 日．新潟コンベンションセンター「朱鷺メッセ」

小澤壮太・前原紀敏・相川拓也・柳澤賢一・中村克典．カラフトヒゲナガカミキリの生殖器官から分離された *Bursaphelenchus* 属線虫．2018 年度日本線虫学会第 26 回大会．2018 年 9 月 6 日．熊本市国際交流会館

相川拓也・前原紀敏・升屋勇人・中村克典・安佛尚志．抗生物質処理によるピロウドカミキリ体内のボルバキアの除去．第 129 回日本森林学会大会．2018 年 3 月 28 日．高知大学

相川拓也・市原優・升屋勇人・安佛尚志・前原紀敏・中村克典．ピロウドカミキリにおける細胞内共生細菌の解析．第 61 回日本応用動物昆虫学会大会．2017 年 3 月 28 日．東京農工大学

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：前原 紀敏
ローマ字氏名：(MAEHARA, noritoshi)
所属研究機関名：国立研究開発法人森林研究・整備機構
部局名：森林総合研究所
職名：主任研究員等
研究者番号(8桁)：20343808

研究分担者氏名：升屋 勇人
ローマ字氏名：(MASUYA, hayato)
所属研究機関名：国立研究開発法人森林研究・整備機構
部局名：森林総合研究所
職名：主任研究員等
研究者番号(8桁)：70391183

研究分担者氏名：中村 克典
ローマ字氏名：(NAKAMURA, katsunori)
所属研究機関名：国立研究開発法人森林研究・整備機構
部局名：森林総合研究所
職名：主任研究員等
研究者番号(8桁)：40343785

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。