

令和元年5月30日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08100

研究課題名(和文)イモゾウムシ病原性原虫の感染伝播機構と宿主代謝制御機構の定性・定量的解析

研究課題名(英文) Qualitative and quantitative analysis of infection and metabolic regulation of *Farinocystis* sp. in the host weevil, *Euscepes postfasciatus*

研究代表者

青木 智佐 (Chisa, Yasunaga-Aoki)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：20264103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：イモゾウムシ個体・個体群での*Farinocystis* sp.の病原力を定性・定量的に評価できるようにするため、原虫オーシストの人工脱嚢法を検討し、ヘキサンによる前処理を施す有効な方法を提示した。次に、オーシストを介した水平伝播では、宿主消化管内におけるオーシスト脱嚢に関与する宿主因子の検討を行うとともに、さまざまなサツマイモ害虫に対する本原虫の感染性を調査し、オーシスト脱嚢における宿主消化管抽出液中のプロテアーゼの関与を明らかにした。また、パルスNMR法により、感染個体での<sup>1</sup>H核緩和時間の増大が認められ、外見上健全個体との相違が認められない感染個体においても、代謝の変化を確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、侵入害虫且つ難防除害虫のイモゾウムシから初めて分離された原虫を対象とした。この原虫病は達成間近の根絶防除事業を阻む深刻な原因となっており、本研究から得られた成果はイモゾウムシ根絶防除に寄与できるものである。また、本原虫の宿主はイモゾウムシに限られており、極めてユニークな生態をもって宿主個体・個体群での感染を維持している可能性が高い。そのため、本研究で明らかとなった原虫の生物学的諸性状は、新たなグレガリナ原虫特性の発見へと繋がるものである。また、イモゾウムシの代謝解析により明らかとなった原虫感染が宿主昆虫に与える影響の一端は、昆虫病理学に大いに貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：A *Farinocystis* neogregarine parasite was isolated from mass-reared colonies of the West Indian sweet potato weevil, *Euscepes postfasciatus*, at the facility of Okinawa Prefectural Plant Protection Center (OPPPC) in 2004. First, in order to evaluate the virulence of *Farinocystis* sp. against the host both qualitatively and quantitatively, artificial excystation of the oocysts was investigated. It revealed that a pretreatment with hexane was most effective for the oocyst excystation. Then, in order to evaluate a horizontal transmission through the oocysts, bioassays against various insect pests of sweet potato were conducted as well as host intestinal factors related to the oocyst excystation were investigated. Several proteases such as serine protease were involved in the oocyst excystation. In the pulse NMR experiment, metabolic changes and differences were detected between infected and non-infected host individuals.

研究分野：昆虫病理学

キーワード： *Farinocystis* sp. *Euscepes postfasciatus* オーシスト人工脱嚢法 スポロゾイト単離 感染培養系  
パルスNMR法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

イモゾウムシ West Indian sweet potato weevil (学名 *Euscepes postfasciatus*) は、西インド諸島原産のサツマイモの重要害虫である。日本での発生は奄美大島以南の南西諸島及び小笠原諸島に限られており、現在その分布拡大を防ぐために特殊害虫に指定され、植物防疫法により厳重に移動規制されている。沖縄県では、不妊虫放飼法を軸としたイモゾウムシの根絶防除事業が展開されている(山岸・下地, 2000)。この不妊虫放飼法には、大量の不妊化用イモゾウムシ成虫の確保が必至である。同県病害虫防除技術センターでは、1994年からイモゾウムシの施設内大量増殖が開始され、週当たり300万頭以上の不妊虫生産を目指してイモゾウムシを大量増殖し、2004年8月初旬までは安定した生産数を確保して継続的に不妊虫放飼を行ってきた。しかし、同年9月以降、不妊化用成虫生産数は急激に低下し、週当たり150万頭前後となった。同時に、成虫の短命化と産卵数の減少が認められたため、それら成虫の磨砕液を検鏡したところ、大量の原虫オーシストが検出された。

著者らはこれまでの研究から、本原虫をアピコンプレックス門、種虫綱、グレガリナ(簇虫)亜綱、新グレガリナ(裂殖簇虫)目、*Farinocystis* 属の1種であると同定した(森田ら, 2007)。また、宿主の短命化や産卵数の減少は、本原虫感染によって引き起こされることが明らかとなった(Kumano et al., 2010)。その後、同センターでは、イモゾウムシ用人工飼料の開発と卵表面殺菌法などの検討が行われ、無菌的な人工飼料育によっても週当たり33万頭までイモゾウムシを大量生産できるようになった。ところが2013年になって、人工飼料育個体群においても本原虫感染が確認され始め、新たな対策が必要となっている。

## 2. 研究の目的

本研究は、サツマイモ塊根育及び人工飼料育イモゾウムシ個体・個体群における本原虫の病原力、感染伝播機構、そして原虫病に应答する宿主代謝制御を解析することによって、原虫病の蔓延を食い止め、不妊化用イモゾウムシの生産数を確保しようとするものである。また一方で、本原虫の宿主に与える影響は大きいことから、現行の不妊虫放飼法での防除効果を増強できるような微生物的防除因子としての利用可能性を検討することを大きな目的としている。具体的には、(1)イモゾウムシ個体及び個体群での本原虫の病原力を定量的に評価できるようにするため、原虫オーシスト人工脱囊法及び原虫活性定量法を確立し、これらの方法を用いて、各種溶媒処理した原虫オーシストの不活化条件を検討、(2)オーシストより脱出してきた原虫スポロゾイトの密度勾配遠心法による分離・回収法を確立するとともに、増員増殖虫体からの *in vitro* 培養系を確立、(3)本原虫の水平伝播機構を解明するため、イモゾウムシ以外のサツマイモ害虫及びその天敵昆虫における本原虫の感染伝播を調査、また、(4)パルス NMR 法により、*Farinocystis* sp. に感染したイモゾウムシの生体内代謝機構を解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 原虫オーシスト人工脱囊法及び原虫活性定量法の確立

原虫オーシストは、沖縄県病害虫防除技術センターにおいて死亡したイモゾウムシ成虫より回収し、Percoll™ 密度勾配遠心法を改変して精製した(新見, 2013)。オーシスト表面の脂質層を除去するために、遠心分離(5,000×g, 3分間)してペレット化したオーシストにエタノールを加えて懸濁し、さらに2倍量の有機溶媒を加えて懸濁した後に、27°Cで3分間静置した。静置後、再びエタノールを加え、遠心洗浄(5,000×g, 1分間)した後、炭酸バッファ(pH9.0)を加えて遠心分離(5,000×g, 3分間)する操作を3反復行った。有機溶媒により前処理したオーシストを遠心操作によりペレット化した後、0.4%トリプシン溶液を加えて懸濁し、27°C条件下で6時間静置した。トリプシンに懸濁したオーシストは、反応を止めるため、遠心分離して上清を除去した後、PBS(pH7.5)に再懸濁した。PBSに懸濁したオーシストを位相差顕微鏡下200倍で観察し、脱囊率を算出した。オーシスト内部にスポロゾイトが見られない、あるいはほとんどのスポロゾイトが放出されていると判断できるものを脱囊したオーシストとみなした。実験は3反復行い、その平均値を用いて各前処理の脱囊率を比較した。得られた脱囊率について Turkey の多重検定(有意水準5%)を行った。

原虫活性を定量するにあたっては、回収したスポロゾイトを遠心分離(1,000×g, 5分間, 4°C)してペレット化した。Fluorescein diacetate を0.2 µg、Propidium iodide を0.05 µg 溶解させた PBS 中で穏やかに懸濁した後、暗所で1時間静置した。静置後、遠心分離(1,000×g, 5分間, 4°C)を行い、PBSを加えて再懸濁して、染色されたスポロゾイトを蛍光顕微鏡下で観察した。

### (2) 原虫スポロゾイトの密度勾配遠心法による分離・回収法及び *in vitro* 培養系の確立

Percoll™ を用いたオーシストとスポロゾイトの分離は、*Cryptosporidium* 属原虫や *Plasmodium* 属原虫で行なわれている方法を改変して行った。調製した Percoll™ 溶液を、60%、40%、20%の順に穏やかに15 ml 遠心管に注ぎ、Percoll™ 密度勾配を作製した。脱囊を誘導したオーシストを懸濁した PBS を Percoll™ 密度勾配の上層に穏やかに注ぎ、遠心分離(3,000×g, 15分間)した。60% Percoll™ 溶液と40% Percoll™ 溶液の間のできるスポロゾイトのバンドをパスツールピペットで回収した。また、表面殺菌した既感染人工飼料育イモゾウムシ幼虫を実体顕微鏡下で解剖して脂肪体を切り出し、30%牛胎児血清及び2%抗生物質を添加した

MGM464 培地中 27°C で培養した。この初代培養を回収して、30% (w/w) Percoll 密度勾配上に重層し、1,800 g、27°C、3 分間遠心して、増員増殖期にある原虫細胞を含むバンドを回収した。これを同培養液に希釈して培養を開始した。

### (3) 各種サツマイモ害虫及びその天敵昆虫における本原虫の感染伝播

供試したイモゾウムシ以外のサツマイモ害虫は、チョウ目ヤガ科のハスモンヨトウ (*Spodoptera litura*)、カメムシ目アブラムシ科のモモアカアブラムシ (*Myzus persicae*) 及びワタアブラムシ (*Aphis gossypii*)、コナジラミ科のタバココナジラミ (*Bemisia tabaci*)、カスミカメ科のクロトビカスミカメ (*Halticus insularis*)、ダニ目ハダニ科のカンザワハダニ (*Tetranychus kanzawai*)、アブラムシ類の天敵昆虫としてコウチュウ目テントウムシ科のナミテントウ (*Harmonia axyridis*) である。各種昆虫への原虫オーシストの接種には、 $1 \times 10^8$  oocysts/ml に調整した精製オーシスト浮遊液を用い、オーシスト浮遊液に浸漬するか、植物葉に添加して吸汁させることにより接種した。その後、25 °C で一定期間飼育した。原虫感染の有無は、原虫感染簡易検出法 (新見ら, 2013) を用いて、特異的像副産物の検出により判断した。供試昆虫を滅菌水で 30 分間洗浄し、体表に付着したオーシストを除去した後、1.5 ml チューブ中でチューブミキサーを用いて磨砕した。磨砕試料よりゲノム DNA を抽出し、PCR により原虫感染の有無を判定した。

### (4) パルス NMR 法によるモゾウムシ生体内代謝の解析

イモゾウムシ幼虫及び成虫への原虫オーシストの接種は、浸漬による経口接種を行った。精製オーシスト浮遊液 ( $1 \times 10^8$  oocysts/ml) 中にイモゾウムシ幼虫または成虫を一定時間浸漬し、経口的にオーシストを摂食させて感染させた。非感染及び感染イモゾウムシ個体をサンプルチューブ (径 5 mm) に入れ、スピン・格子緩和時間 ( $T_1$ ) 及びスピン・スピン緩和時間 ( $T_2$ ) をパルス NMR 装置 (JEOL MU25) により測定した。測定法としては、 $T_1$  は Saturation Recovery 法で、 $T_2$  は CPMG 法を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) 原虫オーシスト人工脱囊法及び原虫活性定量法の確立

本原虫オーシストは FITC について難染性であり、脂質層がこれに関与している可能性があった。そこで、界面活性剤や有機溶媒への浸漬など脂質層に影響を与えうる処理を探索した。FITC による染色強度を指標として各処理を比較した結果、界面活性剤処理では顕著な変化はみられなかったが、有機溶媒処理において FITC の染色強度が増加した。特に、トルエンやキシレン、ヘキサンなど極性の低い有機溶媒において、染色強度の増加は顕著であった。また、オーシストを浸漬したヘキサンを薄層クロマトグラフィーによって分析した結果、ヘキサン中にトリアシルグリセロール (TAG) を含む複数のオーシスト由来の脂質の溶解が確認された。本種オーシストにおいても脂質層が存在することが明らかとなった。

本種オーシストに脂質層が存在することが明らかとなったため、界面活性剤や有機溶媒への浸漬など脂質層に影響を与えうる処理を行った後にトリブシン溶液中に懸濁することで、オーシストの脱囊が見られるかを調査した。その結果、界面活性剤による前処理及びエタノール、アセトン、エチルエーテルを用いた試験区ではオーシストの脱囊率に顕著な変化は見られなかったが、トルエン、キシレン、ヘキサンを用いた前処理をした試験区において 70% 前後の脱囊率が得られた。この 3 種の有機溶媒において、脱囊率に有意な差は見られなかったことや、トルエンやキシレンが劇物指定を受けていることを考慮し、以降の実験において、オーシストの前処理としてヘキサンを用いることとした。

ヘキサンとトリブシンを用いて本種のオーシストの脱囊を誘導できることが明らかとなったが、このとき放出されるスポロゾイトが死細胞であっては有益な脱囊法とは言えない。そこで、スポロゾイトに対し FDA-PI 二重染色を行い、生死を判定した。ヘキサンとトリブシンを用いてオーシストの脱囊を誘導した後、Percoll™ 密度勾配法を用いてスポロゾイトを回収し、FDA-PI 二重染色を行った。その結果、回収されたスポロゾイトは全て FDA 陽性かつ PI 陰性であり、生細胞であることが確認された (Fig. 1)。

*Farinocystis* sp. の感染としては、オーシストを介した水平伝播が考えられている。そのため、原虫病の感染を阻止するため、宿主体内におけるオーシストの脱囊を阻害することが 1 つの方法として挙げられる。しかしながら、本種オーシストの宿主内における脱囊のメカニズム

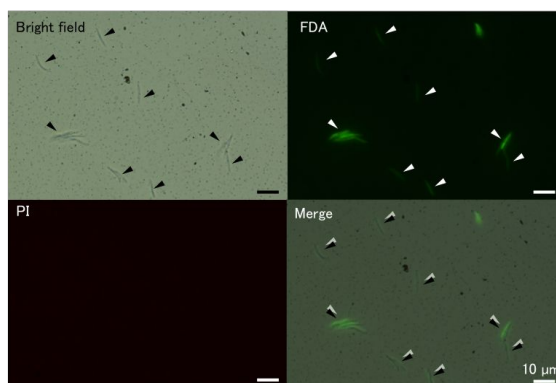


Fig. 1 スポロゾイトの FDA-PI 二重染色像

各 arrowhead はスポロゾイトを指す。

Bright field: 可視光によるスポロゾイトの顕微鏡像; FDA: 緑色蛍光



は知見に乏しい。そこで、宿主腸内におけるオーシストの脱嚢に関連する宿主因子の検討を行った。宿主であるイモゾウムシの幼虫から消化管を採取し、これを磨砕した後、遠心分離した上清を回収することで宿主消化管抽出液を得た。この宿主消化管抽出液にオーシスト懸濁し、脱嚢が誘導されるかを調査した。このとき、ヘキサンによる前処理を行ったオーシストと、前処理を行っていないオーシストの2種類についてそれぞれ試験区を設け、脱嚢率を調査した。その結果、ヘキサンによる前処理を行ったオーシストを宿主消化管抽出液に懸濁した場合のみ脱嚢が確認され、そのときの脱嚢率は約55%であった (Fig. 2)。以降の実験においては、ヘキサンによる前処理を行ったオーシストの脱嚢を誘導する宿主消化管抽出液中の因子を調査した。宿主消化管抽出液中にプロテアーゼ阻害剤を添加した条件下でオーシストの脱嚢率を調査した結果、消化管抽出液にプロテアーゼ阻害剤である complete を加えた場合、オーシストの脱嚢率が対照区の55%に低下した。しかしながら、オーシストの脱嚢は完全には阻害されなかったため、宿主消化管抽出液中にはこれらのプロテアーゼ以外にも脱嚢を誘導する因子が含まれていることが示唆された。ザイモグラフィーによっても、宿主消化管抽出液におけるプロテアーゼの存在を検討した結果、基質特異性の異なる複数のプロテアーゼが確認された。基質にゼラチンを用いた場合に強く検出されるプロテアーゼは、complete による処理を行った試験区ではバンドが検出されなくなったため、セリンプロテアーゼあるいはシステインプロテアーゼであることが示唆された。また、宿主消化管抽出液中には complete によって阻害されるプロテアーゼと、阻害されないプロテアーゼが存在することも確認された。

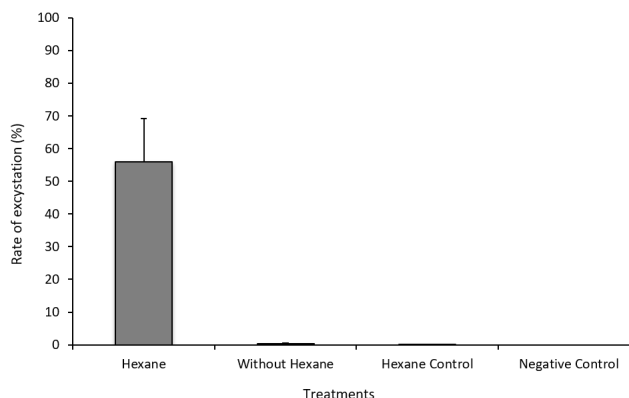


Fig. 2 オーシストのヘキサン処理及び宿主消化管抽出液への懸濁による脱嚢率 (グラフ上の直線は標準偏差を示す)

Hexane: ヘキサンによる前処理を行い宿主消化管抽出液に懸濁; Without Hexane: ヘキサンによる前処理を行わず宿主消化管抽出液に懸濁; Hexane Control: ヘキサンによる前処理を行いPBSに懸濁; Negative Control: ヘキサンによる前処理を行わずPBSに懸濁

### (2) 原虫スポロゾイトの密度勾配遠心法による分離・回収法及び in vitro 培養系の確立

Percoll™ 密度勾配遠心法により、オーシストと脱嚢したオーシストから放出されたスポロゾイトを分離し、スポロゾイトのみを回収することができた。

表面殺菌した既感染人工飼料育イモゾウムシ幼虫を実体顕微鏡下で解剖して脂肪体を切り出し、27°C で培養した。この初代培養から Percoll™ 密度勾配遠心法により増員増殖期にある原虫細胞を含むバンドを回収した。これを同培養液に希釈して培養を開始した。培養開始後、増員増殖期にある鎌状のスポロゾイトは活発に増殖を続けていたが、その後、一部にやや球形の原虫細胞が認められ始め、鎌状の原虫細胞と小型球形の原虫細胞が混在した状態が長期間継続された (Fig. 3)。培養120日後の感染培養には、大型球形の原虫細胞であるガメトシスト (直径約30 µm) が観察され始め、その数が増加していった。現在の感染培養には、依然として多数の鎌状のスポロゾイト様原虫細胞及び小型球形の原虫細胞が認められるとともに、ガメトシストに混在して遊離された多数のオーシストが観察されている。これらのことより、本原虫細胞は一定の栄養条件のみで分裂増殖及び細胞分化が可能であること、またオーシストの自発的な脱嚢の可能性が示唆された。

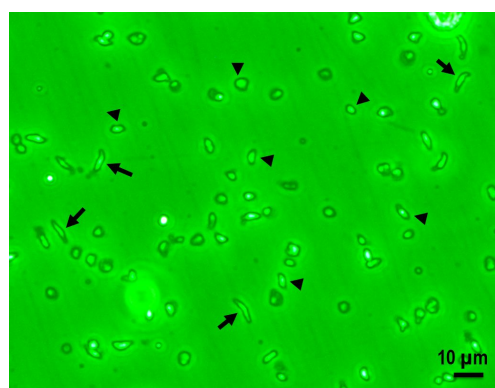


Fig. 3 *Farinocystis* sp. 感染培養  
各 arrow はスポロゾイト様原虫細胞を、arrowhead は球形の原虫細胞を指す。

### (3) 各種サツマイモ害虫及びその天敵昆虫における本原虫の感染伝播

*Farinocystis* sp. の野外での伝播性を検討するために、イモゾウムシ以外のさまざまなサツマイモ害虫及びその天敵昆虫に対する本原虫の感染性を調査した。チョウ目ヤガ科のハスモンヨトウ、カメムシ目のアブラムシ類及びコナジラミ、カスミカメ、ダニ目ハダニ科のカンザワハダニ、そしてアブラムシ類の天敵昆虫としてコウチュウ目テントウムシ科のナミテントウを供試して接種試験を行い、原虫感染簡易検出法により感染の有無を調査したが、いずれの昆虫

種にも本原虫感染は認められなかった。しかしながら、昆虫体表等がオーシストによって汚染され、それを介しての本原虫の伝播の可能性は否定できなかった。

#### (4) パルス NMR 法によるモゾウムシ生体内代謝の解析

パルス NMR 法により、*Farinocystis* sp. に感染したイモゾウムシの生体内代謝の変化を調査した。感染イモゾウムシ成虫個体において、<sup>1</sup>H 核磁気緩和時間 T<sub>1</sub> の有意な延長が認められた。また、特定のシグナル強度が感染個体と非感染個体で明瞭に異なり、外見上健全個体との相違が認められない感染個体において、代謝の変化を確認することが可能であった。

#### < 引用文献 >

Kumano, N., Iwata N., Kuriwada T., Shiromoto K., Haraguchi, D., Yasunaga-Aoki, C., Kohama T. The neogregarine protozoan *Farinocystis* sp. reduces longevity and fecundity in the West Indian sweet potato weevil, *Euscepes postfasciatus* (Fairmaire). *J. Invertebr. Pathol.*, 105, 2010, 298-304.

新見はるか・鶴田幸成・青木智佐・原口 大・飯山和弘・清水 進 イモゾウムシ病原性原虫の宿主幼虫個体への接種と増殖. *Entomotech*, 35, 2011, 9-12.

森田千尋・青木智佐・原口 大・小濱継雄・飯山和弘・清水 進 イモゾウムシ *Euscepes postfasciatus* から分離された *Farinocystis* 様原虫について. *Entomotech*, 31, 2007, 17-19.

山岸正明・下地幸夫 不妊虫放飼法によるゾウムシ類の根絶 (7) イモゾウムシの大量増殖・不妊化・マーキング・輸送・放飼. *植物防疫*, 54, 2000, 476-478.

#### 5 . 主な発表論文等

##### [ 雑誌論文 ] ( 計 3 件 )

Jin, N. Y., Lee, Y. K., Kim, H. J., Kim, Y. S., Youn, Y. N., Yasunaga-Aoki, C. and Yu, Y. M. Pesticide doses and spraying method for optimal pest control in paprika cultivation. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, non-peer reviewed, 63, 2018, 271-279.

[https://catalog.lib.kyushu-u.ac.jp/opac\\_download\\_md/1955396/p271.pdf](https://catalog.lib.kyushu-u.ac.jp/opac_download_md/1955396/p271.pdf)

Jung, Y. B., Kim, J. H., Kwon, H. R., Lim, H. S., Yu, Y. M., Yasunaga-Aoki, C. and Youn, Y. N. cDNA library construction in the multicolored Asian ladybird beetle, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) for gene functional analysis using gateway cloning system. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, non-peer reviewed, 63, 2018, 281-292.

[https://catalog.lib.kyushu-u.ac.jp/opac\\_download\\_md/1955397/p281.pdf](https://catalog.lib.kyushu-u.ac.jp/opac_download_md/1955397/p281.pdf)

Lee, Y. K., Jin, N. Y., Kim, H. J., Youn, Y. N., Yasunaga-Aoki, C. and Yu, Y. M. Selection and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains with biological activity against *Lycoriella ingenua*. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, non-peer reviewed, 63, 2018, 293-302.

[https://catalog.lib.kyushu-u.ac.jp/opac\\_download\\_md/1955398/p293.pdf](https://catalog.lib.kyushu-u.ac.jp/opac_download_md/1955398/p293.pdf)

##### [ 学会発表 ] ( 計 1 件 )

Cassal, M. C., Wiest, S. F., Yasunaga-Aoki, C. and Fiuza, L. M. Two New *Bacillus thuringiensis* strains toxic against *Spodoptera frugiperda* (Lep. Noctuidae). The 2018 International Congress of Invertebrate Pathology and Microbial Control and the 51st Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Aug. 16, 2018, Australia.

#### 6 . 研究組織

##### (1) 研究協力者

研究協力者氏名：福井 翔太

ローマ字氏名：( FUKUI, shota )

研究協力者氏名：松山 隆志

ローマ字氏名：( MATSUYAMA, takashi )

研究協力者氏名：CASSAL, Maximiano Correa

ローマ字氏名：( CASSAL, maximiano correa )