

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19268

研究課題名（和文）無性生殖寄生蜂の遺伝的管理を可能にする新奇生殖システムの解明

研究課題名（英文）A novel reproductive system that enables genetic management of asexual parasitoid strains

研究代表者

前藤 薫 (Maeto, Kaoru)

神戸大学・農学研究科・教授

研究者番号：80346238

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000 円

研究成果の概要（和文）：ヨトウガ類やタバコガ類などの野菜花卉害虫の天敵寄生蜂であるギンケハラボソコマユバチには、通常の有性系統のほかにクローン生殖を行う無性系統がある。本研究によって、無性系統にはほぼ単一の母系系統を形成する多数のミトコンドリアDNAハプロタイプがあることが分かった。さらに、ゲノム規模の一塩基多型解（MIG-seq）により、無性系統には、有性集団と区別できない集団から固有性の高い集団まで著しい遺伝的多様性が存在することが明らかになった。また、飼育集団の家系分析から無性系統には部分的な有性生殖を行うものが含まれることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内共生微生物が関与しない特異なタイプの無性クローン生殖を行う寄生蜂について遺伝学的な解明が進み、予想以上に大きな遺伝的変異が母系系統として蓄積・維持されていることが明らかになった。有性集団と無性系統の間の遺伝子流動の実態は今後の課題として残されたが、無性系統のなかにすでに高い遺伝的変異が存在するので、そこから優れた性質をもつ系統を選抜して野菜害虫の生物的防除素材として利用することができるだろう。

研究成果の概要（英文）：Asexual clonal strains as well as sexual strains are known in *Meteorus pulchricornis* (Hymenoptera, Braconidae), which is a common parasitoid of vegetable and ornamental pests of Lepidoptera, such as *Spodoptera* spp. and *Helicoverpa* spp. We found that there are many DNA haplotypes of the mitochondrial COI gene in asexual strains, most of which belong to a single maternal lineage. A genome-wide SNP analysis (MIG-seq) suggested that the asexual strains have very large genetic variations, i.e., varying from asexual strains with little genetic differentiation from sexual populations, to several unique and distinct asexual strains. Also, partial sexual reproduction (occasional production of males) was indicated for asexual strains by SSR family analyses under rearing conditions.

研究分野：昆虫学

キーワード：寄生蜂 生物的防除 無性系統 単為生殖 遺伝学的集団構造 MIG-seq

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

寄生蜂には農林業害虫の天敵が多く、生物的防除素材として活用が期待されている。ハチ目昆虫は単数二倍体性と呼ばれる特異な性決定様式をもつ。通常の有性生殖では、未受精の単数体は雄に、受精した二倍体は雌に育つ。だが、同じ種のなかに、雄と交尾せずに二倍体の雌を産む性質、つまり産雌性単為生殖を行う系統が見出されることがある。産雌性単為生殖系統では通常系統と比べて増殖率が2倍になる可能性があり、天敵として利用する際に大きな利点となる。

産雌性単為生殖化には幾つかの原因とメカニズムが知られている。大きく分けると、寄生蜂に垂直感染する *Wolbachia* などの細胞内共生細菌類による生殖操作である場合と何らかの核遺伝子の支配による場合がある。それぞれに、減数分裂の途中で単数体が融合あるいは倍加して二倍体に復帰するオートミクシスと、減数分裂せずに二倍体のまま発生が進むアポミクシスがある。オートミクシスは自殖による有性生殖なので、娘の間には遺伝的な差異があり、世代を経るごとにホモ接合度が高まる。一方、アポミクシスは真の無性生殖なので、娘はクローンであり、ヘテロ接合はそのまま維持される。

天敵として活用するには、遺伝的に不安定なオートミクシス系統よりも、有性生殖系統に存在する優れた遺伝的性質が組み合わせて固定されたアポミクシス系統(無性系統)を利用するのが良い。しかし、寄生蜂の産雌性単為生殖は多くがオートミクシスでありよく研究されているが、アポミクシスによるクローン生殖については詳しいことがほとんど分かっていない。

最近になって我々は、チョウ目害虫の幼虫に寄生するコマユバチ科寄生蜂であるギンケハラボソコマユバチ (*Meteorus pulchricornis*) の産雌性単為生殖が、細胞内共生細菌に依らない無性生殖(アポミクシス)であること、さらに無性生殖系統と有性生殖系統がしばしば同所的に分布することを見出した(Tsutsui et al., 2014)。それでは、同所的に生息する両系統はどのような遺伝的な関係にあるのだろうか? この新しいタイプの無性系統を天敵素材として活用するための糸口を得るには、その進化的な起源と遺伝的な性質を明らかにする必要がある。

また、優れた天敵素材を選抜・作出するには、簡便な飼育システムを準備して多数の系統を維持する必要がある。ところが、生きた植物の害虫を寄主とする本種のような寄生蜂では、生餌を与える必要のある本来寄主を用いては多数系統の累代飼育は難しい。乾物を食べる貯穀昆虫など、より飼育の容易な代用寄主による簡便な飼育システムを開発することが重要になる。

2. 研究の目的

本研究では、無性生殖系統を含む本種寄生蜂の遺伝的な構造、そして無性系統と有性系統の間の遺伝子流動の可能性について解明を試みた。また、貯穀昆虫を代用寄主とした飼育システムの構築にも取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) 両生殖系統の分離同定

無性系統と有性系統が同所的に分布する四国地域と近畿地域を中心に日本列島各地から採取され、すでに生殖型が同定されている試料について(2)ミトコンドリア遺伝子の系統解析を行った。その際、一部の系統については核 SSR マーカーを用いた家系分析を行っている。また、両系統がほぼ同頻度で混生する香川県内の大豆栽培圃場においてハスモン幼虫および蜂繭を2年に亘って採集し、羽化した雌成虫に未交尾のまま産卵させる実験を繰り返して無性系統と有性系統を分離同定し、累代飼育系統を作出した。(3)ゲノム規模の一塩基多型解析には先の試料と新たに分離同定した試料をあわせて供試した。また、これまでに集積した累代飼育系統を用いて(4)両生殖系統の飼育交配実験と(5)スジコナマダラメイガを代用寄主とした飼育を行った。

(2) ミトコンドリア遺伝子の系統解析

日本列島各地から得られた両生殖系統の成虫試料から DNA を抽出し、ミトコンドリアの COI 遺伝子の約 650 塩基対を解読した。得られたハプロタイプにヨーロッパ産個体の既知配列を加えて、最節約法(TCS)によるネットワーク系統解析(Popart; Leigh & Bryant, 2015)を行った。また、外群として最近縁種の配列を加えて、ベイズ法(MrBayes; Ronquist et al., 2012)と最尤法(RAxML; Stamatakis, 2006)による分岐系統解析を行った。さらに、近年ニュージーランドに侵入した無性系統の塩基配列を GenBank から取得して比較した。

(3) ゲノム規模の一塩基多型解析

集団規模の試料が得られている、近畿、四国および南西諸島の成虫試料から DNA 抽出を行い、次世代シーケンシング技術(MIG-seq)によって一塩基多型を取得した。MIG-seq(Suyama & Matsuki, 2015)は、高頻度に存在する SSR(マイクロサテライト)配列から設計した汎用プライマーを用いて、SSR 間の塩基配列を網羅的に解読して、多数の一塩基多型を取得する手法である(Wachi et al., 2018)。PyRAD(Eaton, 2014)を用いて一塩基多型の抽出を行い、Admixture(Alexander et al., 2009)によるクラスター解析を行った。

(4) 両生殖系統の飼育交配実験

有性系統と無性系統をそれぞれ、さまざまな条件下で飼育し、異なる生殖型の出現の有無を観察した。また、無性系統の雌成虫を有性系統の雄成虫と一緒に飼育し、配偶行動の有無、そして無性系統に雄の産出など部分的な有性生殖が生じないか観察した。

(5) スジコナマダラメイガを代用寄主とした飼育

スジコナマダラメイガの代用寄主として適合性を評価するため、無性系統成虫に様々な体サ

イズのメイガ幼虫を与えて産卵させ、寄生成功の有無と羽化成虫の体サイズを測定した。また、メイガ幼虫に対する産卵率を高める、メイガ幼虫の体サイズを増やして寄生成功を高めるなど、飼育方法の改善を試みた。

4. 研究成果

(1) 両生殖系統の分離同定

有性系統が西南諸島と北海道を含めた日本列島全域に分布するのに対して、無性系統は本州の南岸地域から四国にかけて帯状に分布していた。SSR を用いた家系分析の結果、無性系統の母親のなかに稀に単数体の雄を産出する部分的有性生殖(産雌雄性単為生殖)を行うもののあることが判明した。もっとも、その息子の生殖能力や母親が交尾して受精娘を産出するかどうかは確認できなかった。

(2) ミトコンドリア遺伝子の系統解析

日本列島全域から 34 個のミトコンドリア COI 遺伝子のハプロタイプが見出され、それらは大きく 2 つのグループ (I と II) に分けられた (図 1、Fujie et al., 2019)。分岐系統解析の結果から、2 つのハプロタイプグループはそれぞれ単系統群であろうと推測された。無性系統の大半はグループ II のハプロタイプをもち、1 つの系統だけがグループ I のハプロタイプを持っていた。グループ I とグループ II の有性系統は、それぞれ日本列島の北部と南部に偏って分布し、両者が接する近辺にグループ II の無性系統が見られた (図 2)。大半の無性系統は単一の起源をもち、ハプロタイプグループ間の交雑によって生じたか、細胞質そのものに無性化の因子が存在している可能性があると考えられた。また、近年になってニュージーランドから報告された系統は、その登録配列が日本産の無性系統のハプロタイプと一致したことから、東アジアからおそらくは人為的に移出したものらしい。

図 1 有性系統と無性系統のミトコンドリア COI 遺伝子のハプロタイプネットワーク (Fujie et al., 2019 より)。

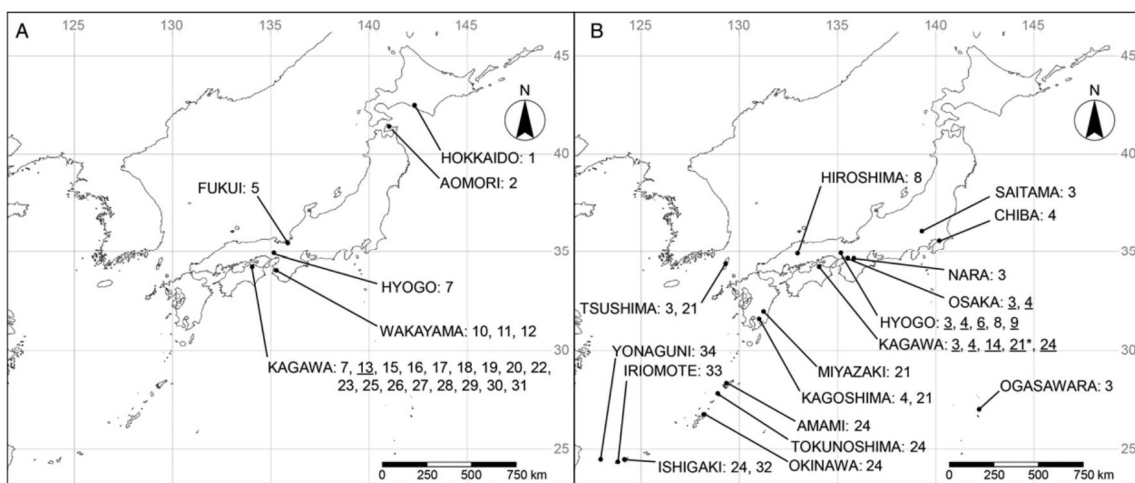
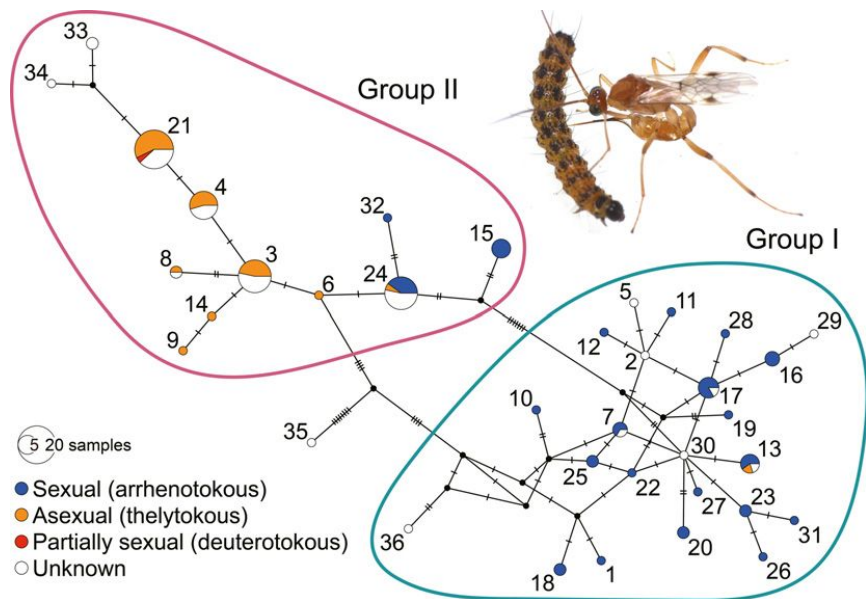


図 2 ハプロタイプグループ I (A) とハプロタイプグループ II (B) の分布。下線のハプロタイプにおいて無性生殖が認められた (Fujie et al., 2019 より)。

(3) ゲノム規模の一塩基多型解析

得られた塩基配列から一塩基多型を含む 575 遺伝子座が抽出された。暫定的なクラスター解析の結果 (図 3) から、供試された個体は、南西諸島の有性集団、四国と近畿の有性集団、

後者の有性集団と遺伝的に区別できない無性集団、および2つの無性集団(、)の5つに分かれた。ヘテロ接合の程度は有性集団と無性集団のあいだに極端な違いが認められず、このことは無性系統が減数分裂を行わないアポミクシス系統であるという Tsutsui et al. (2014)の結論を支持するものであった。また、無性集団間には、有性集団と区別できないものから、それぞれ明瞭に峻別される複数の集団まで、きわめて大きな遺伝的分化が認められた。Abe et al.(2013)は成虫の体色や温度応答性に無性系統間で顕著な差異のあることを報告しているが、本結果はそれと符合する。無性集団間の遺伝的な変異は単性系統が起源した後に徐々に蓄積されたものかも知れないが、一部の無性系統と有性系統の間に遺伝子のやり取りが行われてきた可能性もある。集団間の遺伝的分化や遺伝子流動の程度については詳細を解析中である。

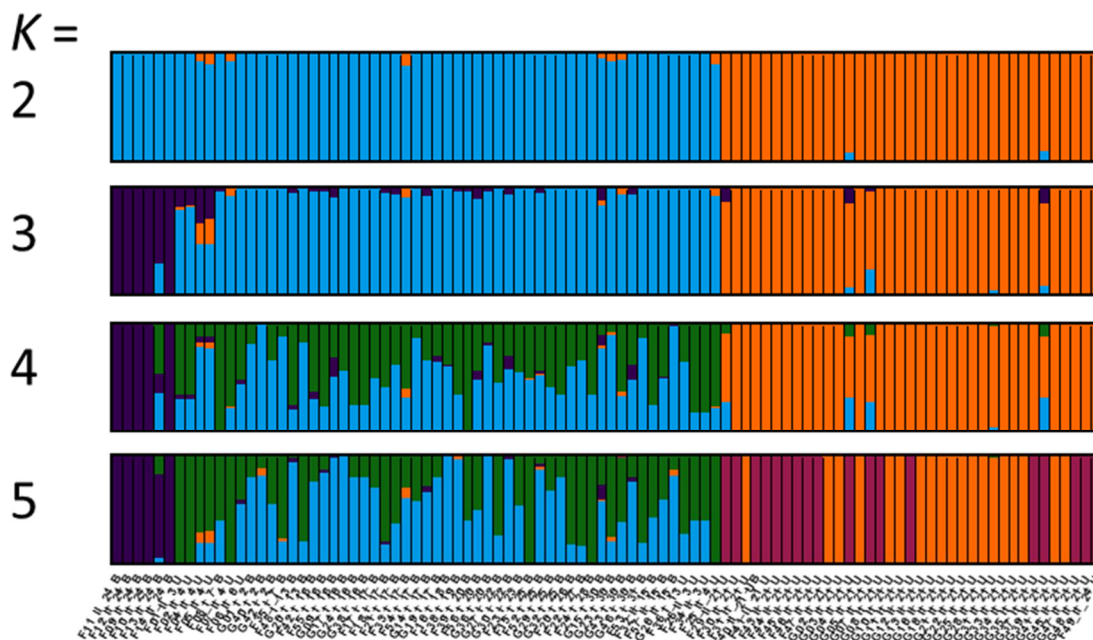


図3 ゲノム規模の一塩基多型の情報(575 遺伝子座)にもとづく有性系統と無性系統のクラスター解析の結果(未発表)。Kは推定されたクラスター数を表す。個体ラベルの末尾がBは有性系統、Uは無性系統。

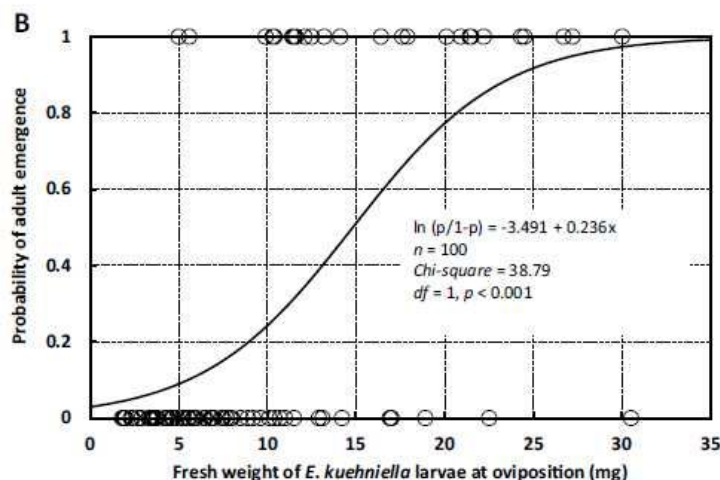
(4) 両生殖系統の飼育交配実験

両生殖系統を様々な日長や温度において累代飼育したが、異なる生殖型の出現を観察することは出来なかった。また、無性系統の雌成虫を羽化後数日のうちに、有性系統の雄成虫と一緒にすると雄の雌に対する配偶行動が頻繁に観察され、交尾に至るペアも認められた。しかし、無性系統の雌がその後息子を生んだり、有性生殖に回復した(つまり雄を生む)娘を生んだりすることは確認できなかった。

(5) スジコナマダラメイガを代用寄主とした飼育

一定の体サイズを超えるメイガ幼虫を代用寄主にして、本種を飼育することに成功した(図4、Nakano et al. 2018)。メイガ幼虫の体サイズを増大するには幼若ホルモン用物質の投与が有効であった。また、LED光を左右交互に点灯させることによってメイガ幼虫の歩行量を増やし、メイガ幼虫に対する産卵効率を向上させることができた。本代用寄主による飼育手法は、本種系統の累代維持だけでなく、効率的な大量増殖にも応用できるだろう。

図4 代用寄主であるスジコナマダラメイガ幼虫の産卵時生体重と寄生蜂の羽化率の関係(Nakano et al., 2018より)



(6) まとめ

ヨトウガ類やタバコガ類などの野菜花卉害虫の天敵寄生蜂であるギンケハラボソコマユバチには、通常の有性系統のほかにクローン生殖を行う無性系統がある。本研究によって、無性系統にはほぼ単一の母系系統を形成する多数のミトコンドリア DNA ハプロタイプがあることが分かった。さらに、ゲノム規模の一塩基多型解析 (MIG-seq) により、無性系統には、有性集団と区別できない集団から固有性の高い集団まで著しい遺伝的多様性が存在することが明らかになった。また、飼育集団の家系分析から無性系統には部分的な有性生殖を行うものが含まれることが示唆された。有性系統と無性系統の間の遺伝子流動の実態は今後の課題として残されたが、多数の無性系統のなかにすでに高い遺伝的変異が存在するので、そこから優れた性質をもつ系統を選抜して生物的防除素材として利用することができるだろう。

引用文献

- Abe, Y., Nishimura, T. and Maeto, K. (2013) Causes of polymorphic melanism and its thermoregulatory function in a parasitoid wasp *Meteorus pulchricornis* (Hymenoptera: Braconidae). *European Journal of Entomology* 110(4): 627-632.
- Alexander, D. H., Novembre, J. and Lange, K. (2009). Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome research* 19: 1655-1664.
- Eaton, D. A. (2014). PyRAD: assembly of de novo RADseq loci for phylogenetic analyses. *Bioinformatics* 30: 1844-1849.
- Fujie, S., Wachi, N., Umemoto, H. and Maeto, K. (2019) Mitochondrial DNA diversity and geographical distribution of sexual and asexual strains of the braconid parasitoid *Meteorus pulchricornis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 167(12): 977-985.
- Leigh, J.W. and Bryant, D. (2015) PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* 6:1110-1116.
- Maeto, K. (2018) Polyphagous koinobiosis: the biology and biocontrol potential of a braconid endoparasitoid of exophytic caterpillars. *Applied Entomology and Zoology* 53(4): 433-446.
- Nakano, S., Gau, J.J. and Maeto, K. (2018) Host suitability of the Mediterranean flour moth for rearing *Meteorus pulchricornis* (Hymenoptera: Braconidae), a polyphagous endoparasitoid of pest lepidopteran larvae. *Applied Entomology and Zoology* 53(3): 291-296.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A. et al. (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539-542.
- Stamatakis, A. (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688-2690.
- Suyama, Y., and Matsuki, Y. (2015). MIG-seq: an effective PCR-based method for genome-wide single-nucleotide polymorphism genotyping using the next-generation sequencing platform. *Scientific Reports* 5: 16963.
- Tsutsui, Y., Maeto, K., Hamaguchi, K., Isaki, Y., Takami, Y., Naito, T. and Miura, K. (2014) Apomictic parthenogenesis in a parasitoid wasp *Meteorus pulchricornis*, uncommon in the haplodiploid order Hymenoptera. *Bulletin of Entomological Research* 104(3): 307-313.
- Wachi, N., Matsubayashi, K.W. and Maeto, K. (2018) Application of next-generation sequencing to the study of non-model insects. *Entomological Science* 21: 3-11.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujie, S., Wachi, N., Umemoto, H. and Maeto, K.	4. 巻 167
2. 論文標題 Mitochondrial DNA diversity and geographical distribution of sexual and asexual strains of the braconid parasitoid <i>Meteorus pulchricornis</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Entomologia Experimentalis et Applicata	6. 最初と最後の頁 977-985
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/eea.12853	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakano, S., Gau, J.J. and Maeto, K.	4. 巻 53
2. 論文標題 Host suitability of the Mediterranean flour moth for rearing <i>Meteorus pulchricornis</i> (Hymenoptera: Braconidae), a polyphagous endoparasitoid of pest lepidopteran larvae	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Applied Entomology and Zoology	6. 最初と最後の頁 291-296
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13355-018-0555-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Maeto, K.	4. 巻 53
2. 論文標題 Polyphagous koinobiosis: the biology and biocontrol potential of a braconid endoparasitoid of exophytic caterpillars	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Applied Entomology and Zoology	6. 最初と最後の頁 433-446
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13355-018-0581-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wachi, N., Matsubayashi, K.W., Maeto, K.	4. 巻 21
2. 論文標題 Application of next-generation sequencing to the study of non-model insects	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Entomological Science	6. 最初と最後の頁 3 - 11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ens.12281	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Gau Jing Je・前藤薫
2. 発表標題 交互照明によって宿主幼虫に対する寄生蜂の産卵を促進できるか？
3. 学会等名 日本昆虫学会第79回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 深野堅哉・前藤薫
2. 発表標題 寄生蜂の繁殖に寄与しない寄主死亡率は飼育環境によって変化する
3. 学会等名 日本昆虫学会第79回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maeto, K.
2. 発表標題 Polyphagous koinobiosis: The biology and biocontrol potential of <i>Meteorus pulchricornis</i> , a braconid parasitoid of exophytic caterpillars
3. 学会等名 9th Congress of International Society of Hymenopterists (CISH2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Gau Jing Je・前藤薫
2. 発表標題 寄生蜂に産卵させるため交互照明によってスジコナマダラメイガ幼虫の動きを増加させる
3. 学会等名 日本昆虫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡澤圭祐・坂本克彦・前藤 薫
2. 発表標題 寄主のJHA処理によるギンケハラボソコマユバチの大型化
3. 学会等名 日本昆虫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前藤 薫
2. 発表標題 コマユバチ科天敵寄生蜂の多様性と生殖生態に関する研究
3. 学会等名 日本応用動物昆虫学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	和智 仲是 (Wachi Nakatada) (40635299)	琉球大学・戦略的研究プロジェクトセンター・特命助教 (18001)	