

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02207

研究課題名（和文）侵入害虫キムネクロナガハムシの生殖を操作する新規共生細菌の伝播メカニズムの解明

研究課題名（英文）Transmission mechanisms of a novel clade of bacterial endosymbionts of the coconut beetle that manipulate host reproduction

研究代表者

高野 俊一郎 (Takano, Shun-ichiro)

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：90725045

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、事前研究で我々がヤシの害虫から発見した、寄主害虫の雄を不妊化できる新たな共生細菌について、遺伝子解析及び電子顕微鏡解析を行い、新属新種のCandidatus Mesenet longicolaとして命名を提案した。またベトナムで行った野外調査により、本細菌と他の昆虫を不妊化できる細菌が重複感染する虫が存在すること、室内交雑実験により、重複感染虫は単独感染虫や無感染虫よりも繁殖上有利なることを明らかにした。これらの結果は、本細菌を用いた害虫防除の基盤を構築するために重要と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昆虫の細胞内に共生し、寄主の母から子に伝播する細菌は非感染雌が感染雄と交尾した時、その雌の卵を殺すという能力がある。これは細胞質不和合性(CI)と呼ばれており、感染雄を不妊雄とできるため、害虫防除への応用が期待されているが、これまでの研究はWolbachiaに限定されていた。今回、我々がCIを引き起こす新たな細菌のドラフトゲノムを得て、分類学的地位を明らかにし、新属新種として命名提案したことは、CI研究の発展に寄与すると考えられる。また、野外、室内実験により、重複感染がCIに影響を及ぼす可能性を示唆したことは、これら細菌を利用する害虫防除法の確立のため重要と考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have proposed a new genus and species, “Candidatus Mesenet longicola”, for the bacterial symbionts, which induce cytoplasmic incompatibility (CI) in the coconut beetle, based on the draft genome and morphological properties of the bacteria. Field studies showed that there were beetles infected with both Ca. M. longicola and Wolbachia in Vietnam. Cross tests indicate that doubly infected insects have a reproductive advantage relative to that of single infected insects and uninfected insects. These findings are considered important to develop a pest control strategy using Ca. M. longicola.

研究分野：昆虫生態学

キーワード：共生微生物 生物的防除 侵入害虫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

昆虫やダニなどの節足動物の体内に共生し、主に寄主の母から子に母系伝播する細菌は寄主の生殖を様々な形で操作する。その一つに、細菌に感染した雌が雄と交尾した時、雄が感染しているかどうかにかかわらず雌の卵は発育するが、非感染雌が感染雄と交尾した時、その雌の卵が孵化しないという現象がある。これは細胞質不和合性 (CI: Cytoplasmic Incompatibility) と呼ばれており、感染雄は非感染個体群中では言わば不妊雄となるため、害虫防除への応用が検討されている。これまで、CI 研究のほとんどは *Wolbachia* に限定されていたが、我々は CI を引き起こす *Wolbachia* とは異なる新たな共生細菌をココヤシの侵入害虫であるキムネクロナガハムシ (*Brontispa longissima*) から発見した。この新たな細菌を生物的防除に利用することが期待されるが、基礎的な情報となる分類学的地位や伝播のメカニズムは明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

(1) 新たな共生細菌の分類学的地位を明らかにするため、その遺伝子および形態を近縁種と比較する。

(2) 新たな共生細菌の伝播メカニズムを明らかにするため、野外における感染の広がりを調査するとともに室内実験で CI による致死率を調査する。

3. 研究の方法

(1) 沖縄とベトナムのホーチミンでキムネクロナガハムシ成虫を採取し、新たな共生細菌に感染している雌 1 頭ずつから子孫を増やし、1 雌系統を樹立した。それぞれの系統のハムシ雌成虫 5 頭から卵巣を摘出し、DNA を抽出した。抽出した DNA を精製し、寄主ハムシのゲノムを除去した後、イルミナ MiSeq でシーケンスした。また、細菌がどこに存在するのかを明らかにするためにハムシ卵母細胞の FISH 解析を行うと共に、形態を明らかにするために透過型電子顕微鏡による観察を行った (Takano et al. 2021)。

(2) ベトナムのホーチミンでハムシの細菌感染状況を調べるため、庭木や街路樹として植えられているココヤシからハムシ成虫を採取した。採取したハムシから DNA を抽出し、新規細菌及び *Wolbachia* に特異的プライマー (Takano et al. 2017) を用いて両細菌への感染状況を調査した。調査は 2019 年 3 月、6 月、及び 2020 年 2 月に行った。また、この調査の結果、感染状況の異なるハムシ、すなわち新規細菌のみに感染するハムシ (以降 M)、*Wolbachia* のみに感染するハムシ (W)、双方に感染するハムシ (MW)、無感染のハムシ (N) が存在することが明らかとなったため、それぞれについて交雑試験を行い CI の有無を確認した。ハムシ以外の節足動物への細菌の水平伝播の可能性を検証するため、ハムシを採取したココヤシに他の節足動物がいた場合それらを採取し、感染の有無を確認した。

4. 研究成果

(1) MiSeq によるシーケンスの結果、沖縄系統では 82 本、ベトナム系統では 89 本の contig からなるドラフト配列を得た。本細菌のゲノムサイズは 1.3Mb、GC content は 32.1% であり、*Wolbachia* に近い値を示した (表 1)。43 のマーカー遺伝子を用いた系統解析及び 16SrRNA 遺伝子の配列解析の結果、本細菌は *Anaplasmataceae* 科に属し、これまで知られている最も近縁な細菌種から属レベルあるいはそれ以上に離れた単系統を形成することが分かった。透過型電子顕微鏡による観察の結果、細菌は楕円から桿状で長さは約 1 μm であること、FISH 解析から、ハムシ卵母細胞の前方先端に密集することが明らかになった。これらの結果から、本細菌を新属新種の *Candidatus Mesenet longicola* として提案した (Takano et al. 2021)。また、*Wolbachia* で CI に

表1. Genome features of *Ca. M. longicola*[†] (Takano et al. 2021 より改変)

	sGL2 (沖縄系統)	sL5 (ベトナム系統)	wPip (<i>Wolbachia</i>)	wMel (<i>Wolbachia</i>)
Total sequence length (bp)	1,309,651	1,302,764	1,482,355	1,267,782
Number of contigs	82	89	1	1
N50 (bp)	23,999	22,991	N.A	N.A
GC content (%)	32.1	32.1	34.2	35.2
Number of CDSs	1,157	1,122	1,386	1,270
Average length of CDS	939	953	944	852
Number of rRNAs	3	3	3	3
Number of tRNAs	33	33	34	34

果、細菌は楕円から桿状で長さは約 1 μm であること、FISH 解析から、ハムシ卵母細胞の前方先端に密集することが明らかになった。これらの結果から、本細菌を新属新種の *Candidatus Mesenet longicola* として提案した (Takano et al. 2021)。また、*Wolbachia* で CI に

関与することが知られている遺伝子と相同性を持つ遺伝子を複数同定した。これらの遺伝子と既知遺伝子の相同性は低かったが、同様のタンパク質ドメインを含み、2つの遺伝子がペアで存在したことから、*Ca. M. longicola* が引き起こす CI に関与する可能性があると考えられた。今後これらの遺伝子の機能を調べる事により、新たな CI の分子的メカニズムの解明に繋がると考えられる (Takano et al. 2021)。

(2) 野外調査の結果、ホーチミン市近郊では、北西部では W 系統が優占的となっており、北東部及び中央部の一部に M 系統が、その他の地域に MW 系統が存在することが分かった (図1)。この傾向は 3 回の調査で大きく変わることは無かった。

ハムシを採取したココヤシから、数種のハムシの捕食者 (ハサミムシ、アリ、クモ) 及び寄生蜂

(*Asecodes hispinarum*, *Tetrastichus brontispa*) が採取されたが、いずれも *Ca. M. longicola* には感染していなかった。このことから、捕食や寄生を介し *Ca. M. longicola* が水平伝播する可能性は低いと考えられた。

CI 能力を室内で調査した結果、M 系統、W 系統共に CI を引き起こすものの、CI による致死率は 100% ではなかった (図2)。また、M 雄によって引き起こされた CI は W 雌によって解除されず、逆に W 雄によって引き起こされた CI は M 雌によって解除されない、所謂 bidirectional CI が起こっていることが分かった (図2)。MW 雌は W 雄、M 雄いずれによって引き起こされた CI も解除することができた。また、MW 雄が M 雌と交尾した場合 CI は起こらないが、MW 雄が W 雌と交尾した場合 CI が起こることが分かった (図2)。このことから、繁殖上 MW 雌が最も有利となり (M 雄、W 雄、MW 雄の CI を解除できる) 次いで M 雌 (M 雄と MW 雄の CI を解除できる) W 雌 (W 雄の CI を解除できる) N 雌 (CI を解除できない) の順になると考えられた。

今後は、MW 雄の CI を M 雌が解除できるメカニズムを解明することにより、重複感染が CI に及ぼす影響を明らかにすることが期待される。野外での感染状況については、本試験では CI 能力との関係は明らかにならなかった。しかし、より長期間の野外調査及び CI 以外の要因について調査することにより、将来的には野外での感染の拡大予想が可能になると考えられる。

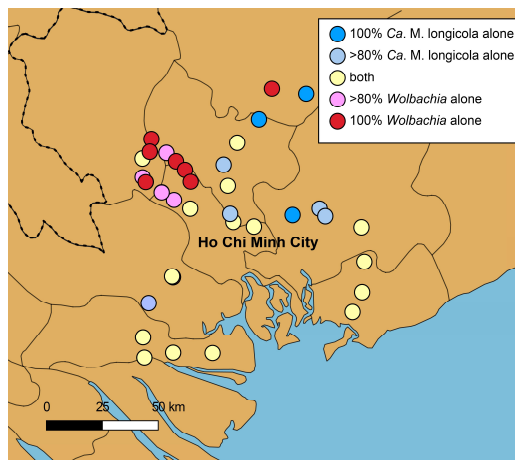


図1. ホーチミン市近郊でのハムシの共生細菌感染状況

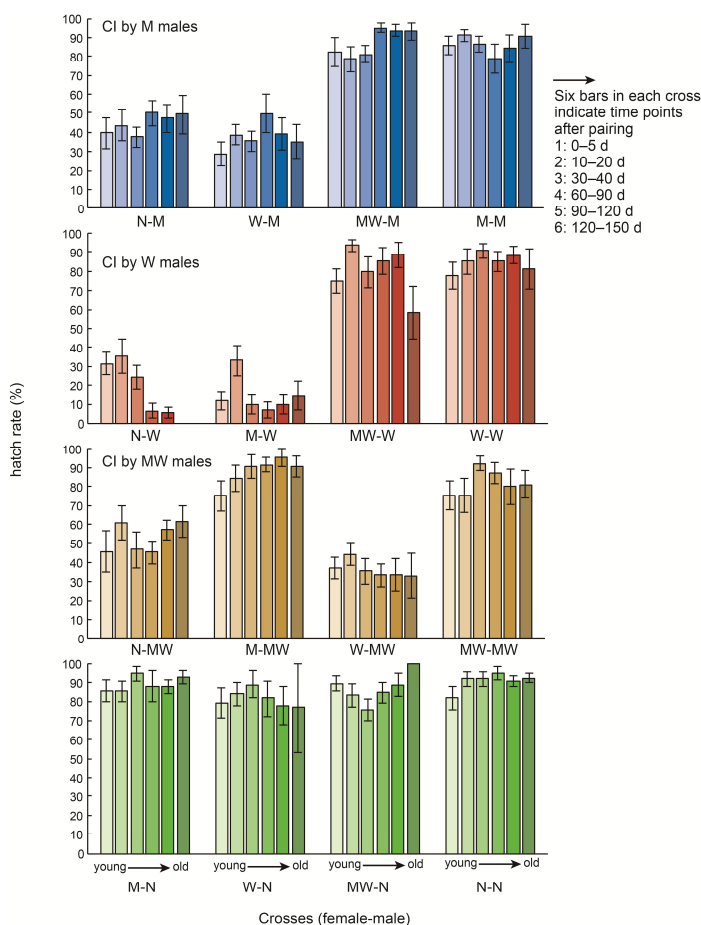


図2. 重複感染する共生細菌による CI

< 引用文献 >

Takano S et al. (2017) PNAS 114:6110–6115

Takano S, Gotho Y, Hayashi T (2021) Microbial Ecology 82:512–522

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 Takano Shun-ichiro, Gotoh Yasuhiro, Hayashi Tetsuya	4. 巻 82
2. 論文標題 “Candidatus Mesenet longicola”: Novel Endosymbionts of Brontispa longissima that Induce Cytoplasmic Incompatibility	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbial Ecology	6. 最初と最後の頁 512-522
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00248-021-01686-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 高野俊一郎	4. 巻 56
2. 論文標題 南西諸島におけるキムネクロナガハムシの分布	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 昆虫と自然	6. 最初と最後の頁 7-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高野俊一郎、後藤恭宏、林哲也
2. 発表標題 宿主昆虫を不妊にする新たなリケッチア目細菌のゲノム特性と不妊化に関与する遺伝子の探索
3. 学会等名 九州微生物研究フォーラム2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高野俊一郎、後藤恭宏、林哲也
2. 発表標題 “Candidatus Mesenet longicola” キムネクロナガハムシに感染し細胞質不和合(CI)を引き起こす新規細菌
3. 学会等名 第65回日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高野俊一郎
2. 発表標題 外来生物の侵入メカニズムと生物的防除法
3. 学会等名 第379回昆虫学土曜セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高野俊一郎、Dat Nguen
2. 発表標題 ベトナムにおける侵入害虫キムネクロナガハムシに感染する新規ボルバキア様細菌の分布とCI能力
3. 学会等名 第64回日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2020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	古屋 成人 (Furuya Naruto) (10211533)	九州大学・農学研究院・教授 (17102)	
研究分担者	津田 みどり (Tuda Midori) (20294910)	九州大学・農学研究院・准教授 (17102)	

	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
研究協力者	林 哲也 (Hayashi Tetsuya)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	後藤 恭宏 (Gotoh Yasuhiro)	九州大学・医学研究院・助教 (17102)	
研究協力者	グエン トゥアン ダット (Nguyen Tuan Dat)	九州大学・農学研究院・大学院生 (17102)	

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0件

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			
ベトナム	Nong Lam University			