

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05667

研究課題名(和文) 共生細菌が駆動する宿主害虫イモゾウムシの繁殖形質の進化の解明と防除技術への展開

研究課題名(英文) Elucidation of the evolution of reproductive traits of the host pest, sweet potato weevil, driven by symbiotic bacteria and its application to control technology.

研究代表者

熊野 了州 (KUMANO, Norikuni)

帯広畜産大学・環境農学研究部門・准教授

研究者番号：90621053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：サツマイモの難防除害虫であるイモゾウムシは、外骨格や交尾器の硬化に必要なクチクラ形成を、共生細菌ナルドネラに依存する。外骨格や交尾器は雌による選択や精子輸送で重要な役割をになっており、共生細菌が宿主の性選択に直接関与することを強く示唆する。そこで本研究では、イモゾウムシの共生細菌保有量を操作した個体を用い、交尾率や交尾行動を調査した。その結果、蛹期に熱処理(31℃)した個体で細菌保有量が減少し、処理個体を用いた配偶行動の観察により、雄のマウント回数の増加と交尾率の上昇、交尾時間の短縮を確認した。また、雄交尾器のトゲ数の減少や、次世代の出現数を減少させることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サツマイモはイモゾウムシの被害を受けると、毒性のあるイボメアマロンなどを分泌する。この物質は強毒性であるため、サツマイモがゾウムシ類の被害を受けた場合、被害芋は家畜の餌にもならず、その経済的損失は極めて多い。現在のところ不妊虫放飼法による防除が沖縄県で行われているが、防除効果を向上させる新たな技術が必要とされている。本研究の成果は、蛹期の熱処理により、処理雄の交尾率の上昇することが明らかになった。寄主生物の性淘汰における共生細菌の役割はほとんど明らかになっておらず、今後の研究でその原因が解明されれば、不妊虫放飼法による防除効果を向上させる新規技術となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The sweet potato weevil, *Euscepes postfasciatus*, depends on the symbiotic bacterium for the formation of the cuticle, which is necessary for the hardening of the exoskeleton and/or genitalia. These play important roles in the sexual selection by female and sperm transport and strongly suggest that the symbiont is directly involved in host sexual selection. In this study, we investigated the mating behavior of this weevil by manipulating the amount of symbiotic bacteria it possesses. We observed an increase in the number of male mounting behavior before copulation, an increase in the mating rate, and a shortening of the copulation duration in the treated individuals. In addition, the number of spines on male genitalia was reduced, and the number of the next generation was also reduced.

研究分野：行動生態学

キーワード：イモゾウムシ 共生細菌 性淘汰 共進化 配偶行動

1. 研究開始当初の背景

サツマイモは肥料をほとんど必要とせずビタミン A を豊富に含むため、FAO (国際連合食糧農業機関) により栽培が推奨され、熱帯・亜熱帯の多くの発展途上国の住民の主要なエネルギー源となっている。サツマイモは害虫による食害で、苦味や臭みの原因物質となる強毒性の生理活性物質を自ら生産するが、その原因となる 2 種のゾウムシ(イモゾウムシ *Euscepes postfasciatus*、アリモドキゾウムシ *Cylas formicarius*) の化学的防除は困難で、防除技術の確立が世界的な課題となっている。しかし、分布が主に発展途上国に限られるこれらのゾウムシ類の研究は世界的にもほとんど進んでおらず、基礎生態の解明や防除技術の開発において、ゾウムシ類の分布する日本の果たす役割は大きい。

現在日本では鹿児島県奄美群島喜界島と沖縄県本島周辺離島で、生物が持つ本質的な行動の 1 つである配偶行動を利用した「不妊虫放飼法」によるゾウムシ類の根絶事業が進められている。2 種のゾウムシのうちアリモドキゾウムシは、性フェロモンを用いた強力な密度抑圧と不妊虫放飼法により、沖縄県久米島や津堅島での根絶に成功した。しかし、イモゾウムシには有効な密度抑圧法が確立されておらず、防除を進めるには現在のところ不妊虫放飼法しかない。不妊虫放飼法で高い防除効果を得るには、交尾・受精能力(以降、性的能力と呼ぶ)が高い雄を生産することが必要とされており、本種の配偶行動の理解が極めて重要な課題となっている。

昆虫には生存において重要な機能を体内の共生細菌に依存するものが存在し、一部のゾウムシでは、外骨格や交尾器の硬化に必要なクチクラ形成を共生細菌に依存する。外骨格や交尾器は、体サイズが強く関与する雌による選択や精子輸送で重要な役割を持っており、このことは共生細菌が宿主の性選択に直接関与することを示唆する。特に本種の雄交尾器には、雌雄の繁殖をめぐる対立を生み出す鋭いトゲが付属しており、共生細菌がトゲ形成に関与することで、宿主の性的対立を激化させ、配偶者選択を複雑化させるよう機能している可能性が高い。本研究ではサツマイモの難防除害虫イモゾウムシとそのクチクラ質形成に関与する共生細菌ナルドネラの系を利用し、クチクラ形成を操作することで宿主の性的対立を緩和し、交尾器挿入時の雌内部構造の観察や雄由来物質輸送(精子や再交尾抑制物質)を定量化することで、宿主の配偶行動での共生細菌の役割を明らかにする。

2. 研究の目的

昆虫には生存において重要な機能を体内の共生細菌に依存するものが存在し、一部のゾウムシでは、外骨格や交尾器の硬化に必要なクチクラ形成を共生細菌に依存する。外骨格や交尾器は、体サイズが強く関与する雌による選択や精子輸送で重要な役割を持ち、このことは共生細菌が宿主の性選択に直接関与することを示唆する。特に本種の雄交尾器には、雌雄の繁殖をめぐる対立を生み出す鋭いトゲが付属しており、共生細菌がトゲ形成に関与することで、宿主の性的対立を激化させ、配偶者選択を複雑化させるよう機能している可能性が高い。本研究ではサツマイモの難防除害虫イモゾウムシとそのクチクラ質形成に関与する共生細菌ナルドネラの系を利用し、クチクラ形成を操作することで宿主の性的対立を緩和する操作を施し、配偶行動を調査する。さらに、次世代への影響(出現次世代数、雌雄比、体サイズ)についても調査を行い、共生細菌の存在が寄主であるイモゾウムシの適応度に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 共生細菌の除去

一般に、共生細菌は熱に弱い(Reno et al., 2019)。そこで本研究では、飼育温度を利用してイモゾウムシ体内の共生細菌量を操作し、配偶行動に及ぼす影響を調査した。具体的には、羽化前後のイモゾウムシを一時的に高温条件下で飼育することで、体内の共生細菌量を操作した。ただ、共生細菌除去に最適なステージが本種で明らかでないため、はじめに処理条件の検討をおこなった。

温度設定(25℃, 31℃)を行ったそれぞれのインキュベーター(14L10D)に、96well プレートに採取した個体を入れ、各処理温度 7 日間インキュベーター内で保存した。保管時には十分な加湿をおこなった。処理は、1) 蛹期に温度処理を行い羽化してすぐ回収したものを(蛹処理)、2) 温度処理後 20g サツマイモ片を入れた 90ml プラスチックカップに移し、25℃ で 2 週間飼育した後回収したものを(蛹 2 週間処理)、3) 羽化間もない成虫を 1 週間温度処理した後回収したものを(成虫処理)とした。回収した試料は、鞘翅を、ピンセットを用いて取り外し、鞘翅を葉包紙に包んで保存し、虫体は DNA 抽出までアセトンで保存した。体サイズの指標として左鞘翅の長さを、双眼顕微鏡用デジタルカメラを用いて撮影し、ソフトウェアを用いて測定を行った。共生細菌量は定量 PCR を用いて定量化した。

(2) 配偶行動

温度処理が交尾行動に与える影響を調査した。蛹化初日のイモゾウムシを採集し、温度設定を行ったインキュベーター内に置き、各処理期間(25 7日間, 31 7日間)、インキュベーター内で保存した。その後、羽化したイモゾウムシを雌雄判別し、雌雄を分け 25 (14L10D)で2週間飼育した。コントロール処理で性成熟まで飼育した個体と温度処理を行った個体を、1頭ずつ雌雄のペアになるよう同じシャーレ(35×10mm)に入れ、25、湿度40%の暗条件で2時間(18:00-20:00)放置した。雌雄の組み合わせは、コントロール処理オス vs コントロール処理メス(CC)、コントロール処理オス vs 高温処理メス(CH)、高温処理オス vs コントロール処理メス(HC)、高温処理オス vs 高温処理メス(HH)の4つである。調査の間、5分おきに赤色LEDでペアごとに行動を観察した。観察する行動は、“交尾前マウント”、“交尾”、“交尾後マウント”とし、観察時にはその開始時間と終了時間を記録するとともに、観察終了後にそれぞれの継続時間を算出した。交尾前マウントは、求愛の強さの指標としてその回数も記録した。観察終了後、交尾をしたペアは、オスは体サイズと生殖器の調査のために個体ごとにアセトンで保存し、メスは20gサツマイモ片を入れた90mlプラスチックカップに入れ10日間産卵させ、その後、別のサツマイモ片を入れた90mlプラスチックカップに移し、再び10日間産卵させた後に、アセトンで保存した。

(3) オス生殖器のトゲの数と形状の測定

オスは交尾器(挿入器)を、ピンセットを用いて抜き出し、内陰茎の特にトゲが発達した部分を、切り離し、切り離した部分をグリセリン(3 μ l)を置いたスライドガラスに乗せ、カバーガラスを被せた。そして、トゲの本数、角度を計測のために、偏光顕微鏡(eclipse E600, ニコン, Tokyo)の対物レンズ20倍、接眼レンズ10倍で測定を行った。トゲの本数は、撮影した画像を基に茶色く硬化したものを計測した。トゲの角度は、特に発達した5本を各個体から選び、陰茎接合部を起点に底辺先端部、頂点の3点を取り、その内側の鈍角を計測した。

(4) 次世代数

交尾実験で交尾をしたメスに、産卵させたサツマイモ片を、コントロール条件に設定したインキュベーター内で保存した。その後、イモゾウムシの生活史を考慮し、5週目以降から毎日次世代の出現を確認し、出現した次世代は雌雄判別を行った後、出現した数を計測し、バイアルにアセトンかアルコールで保存した。

4. 研究成果

(1) 共生細菌の除去

オスは、コントロール条件(25)で(表1)、羽化直後と羽化1週間間に有意差はなく($p = 0.3331$, GLM)、羽化1週間から2週間で、保有量が減少する傾向が見られた($p = 0.053$, GLM)。羽化直後から羽化2週間で保有量が減少した($p = 0.0018$, GLM)。また、温度処理によるナルドネラ保有量への影響(図2)は、オスでは蛹処理(コントロール処理: $1.89E + 06 \pm 1.22E + 08$ コピー数[mean \pm SD], $n = 14$; 高温処理: $1.45E + 06 \pm 8.08E + 05$, $n = 14$) ($p = 0.2929$, GLM)と成虫処理(コントロール処理: $9.69E + 05 \pm 8.10E + 05$, $n = 15$; 高温処理: $6.68E + 05 \pm 8.32E + 05$, $n = 9$) ($p = 0.266$, GLM)では有意差はないものの、高温になるほどナルドネラ保有量の減少が見られた。有意差があったのは、蛹2週間処理(コントロール処理: $1.99E + 05 \pm 2.27E + 05$, $n = 12$; 高温処理: $2.17E + 04 \pm 5.56E + 04$, $n = 13$)で高温処理でのナルドネラ保有量の減少がみられた($p = 0.01534$, GLM)。これらの結果から、蛹2週間処理(31)がイモゾウムシの共生細菌をコントロールするのに妥当だと考えられた。

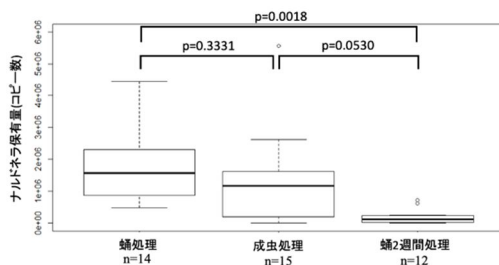


図1 コントロール条件でのオスのナルドネラ保有量の変化

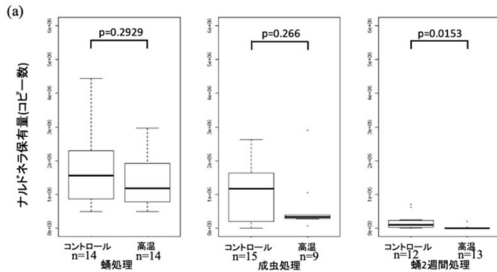


図2 高温処理によるナルドネラ保有量の変化, (a)オス

(2) 配偶行動

交尾率をオス処理温度とメス処理温度の交互作用を解析したところ(表4),雌雄の温度処理のどちらも高温処理で交尾率が上昇した(オス [コントロール: 47.66%, n = 107; 高温処理: 55.81%, n = 43]; メス[コントロール: 45.45%, n = 88; 高温処理: 56.45%, n = 62])(オス温度処理: $p = 0.0427$, メス温度処理: $p = 0.0475$, 交互作用: $p = 0.0350$). オスでは(表5, 図6), コントロール処理(交尾個体: 2.20 ± 0.15 mm [mean \pm SD], n = 51; 未交尾個体: 2.00 ± 0.15 , n = 56) ($p = 4.31E-15$, GLM)と高温処理(交尾個体: 2.09 ± 0.15 , n = 24; 未交尾個体: 1.89 ± 0.16 , n = 18) ($p = 1.76E-07$, GLM)の両方で、体サイズの大きい個体により交尾を行い、高温処理を行ったオスがより交尾を行った(図3) ($p = 2e-16$, GLM).

各交尾行動の継続時間をオス温度処理で比較した場合(図4),交尾前マウント(コントロール: 14.98 ± 17.99 分 [mean \pm SD], n = 51; 高温処理: 12.97 ± 13.86 , n = 24) ($p = 0.79512$, GLM)と交尾後マウント(コントロール: 20.53 ± 7.56 , n = 51; 高温処理: 17.46 ± 5.19 , n = 24) ($p = 0.632$, GLM)で違いはなかったが、交尾(コントロール: 11.65 ± 16.55 , n = 51; 高温処理: 10.01 ± 5.94 , n = 24)で、高温処理で時間が短くなる傾向があった($p = 0.0516$, GLM).

マウント回数を、オス温度処理で比較した場合(表7, 図9),交尾をしたオス(コントロール: 0.98 ± 0.37 回 [mean \pm SD], n = 51; 高温処理: 0.92 ± 0.39 , n = 24)では高温処理による変化は見られなかった($p = 0.77020$, GLM). しかし、交尾をしなかったオス(コントロール: 1.16 ± 0.68 , n = 103; 高温処理: 1.72 ± 1.34 , n = 69)では、高温処理でマウント回数が増加した($p = 0.000823$, GLM).

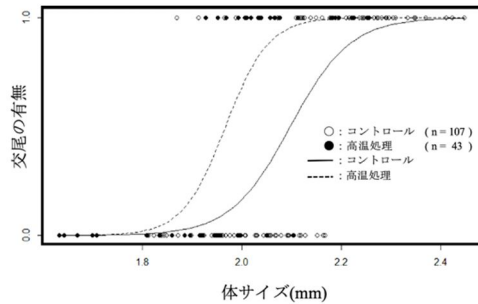


図3 オスの体サイズと交尾成功の関係

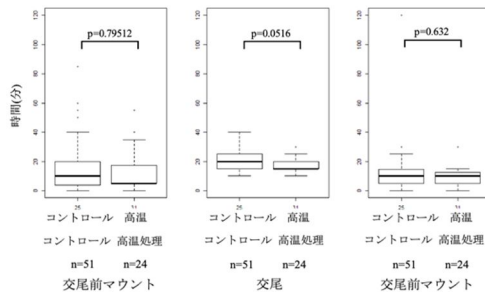


図4 高温処理が配偶行動に及ぼす影響

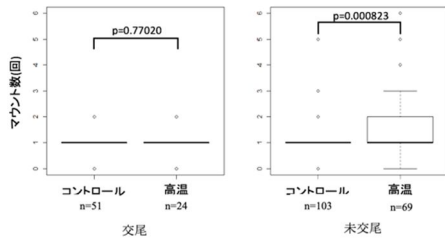


図5 高温処理がマウント行動に及ぼす影響

(3) オス生殖器のトゲの数と形状の測定

交尾器のトゲへの影響は(図6), トゲ本数(コントロール: 12.98 ± 2.09 本 [mean \pm SD], $n = 50$; 高温処理: 11.35 ± 1.82 , $n = 26$)に変化はないが ($p = 0.25$, GLM), トゲの角度(コントロール: $125.28 \pm 13.68^\circ$ [mean \pm SD], $n = 50$; 高温処理: 119.10 ± 16.10 , $n = 26$)は高温処理で減少した ($p = 2E-16$, GLMM).

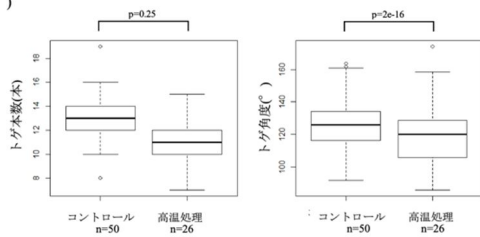


図6 高温処理がトゲの数や形状に及ぼす影響

(4) 次世代数

次世代の出現数(コントロール: 30.50 ± 13.15 , $n = 42$ 家系; 高温: 28.83 ± 12.12 , $n = 20$ 家系)は(図7), 親の体サイズを考慮してオスの温度処理でみた場合, 全体の出現数が減少したが性別ごとの変化はなかった(次世代出現数: $p = 0.0446$, GLM). また, 同様にメスの温度処理でみた場合, 高温処理による次世代の出現数に変化はなかった(次世代出現数: $p = 0.5312$, GLM).

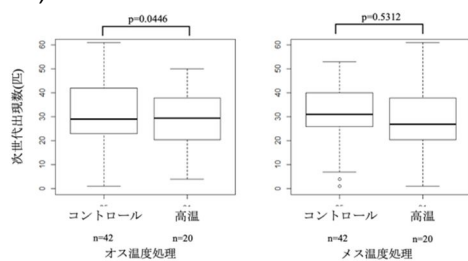


図7 高温処理が適応度に及ぼす影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 鶴井（佐藤）香織	4. 巻 30
2. 論文標題 イモゾウムシに見られる雌雄の空間的分布の偏り：集団増殖率を下げる行動メカニズムに関する考察	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 環動昆	6. 最初と最後の頁 151 ~ 159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11257/jjeez.30.151	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nunohiro Ayame, Kumano Norikuni	4. 巻 168
2. 論文標題 Effects of high CO2 on mating success, mating duration, and sperm transfer in the West Indian sweet potato weevil, <i>Euscepes postfasciatus</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Entomologia Experimentalis et Applicata	6. 最初と最後の頁 387 ~ 397
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/eea.12885	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 Kumano Norikuni, Tsurui-Sato Kaori, Teruya Kiyohito, Toyosato Tetsuya	4. 巻 114
2. 論文標題 Female Marking via Rubidium-Labeled Ejaculates in the West Indian Sweetpotato Weevil (Coleoptera: Curculionidae)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Economic Entomology	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jee/toab049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Isa Mutsumi, Kumano Norikuni, Tatsuta Haruki	4. 巻 6
2. 論文標題 When a male perceives a female: the effect of waxy components on the body surface on decision-making in the invasive pest weevil	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Royal Society Open Science	6. 最初と最後の頁 181542 ~ 181542
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1098/rsos.181542	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 Atsushi Honma Norikuni Kumano Suzuki Noriyuki	4. 巻 75
2. 論文標題 Killing two bugs with one stone: a perspective for targeting multiple pest species by incorporating reproductive interference into sterile insect technique	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pest Management Science	6. 最初と最後の頁 565-570
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ps.5202	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kumano Norikuni, Haraguchi Dai, Tsurui-Sato Kaori	4. 巻 53
2. 論文標題 Effects of X-ray irradiation on male sperm transfer ability and fertility in the sweetpotato weevils <i>Euscepes postfasciatus</i> (Coleoptera: Curculionidae) and <i>Cylas formicarius</i> (Coleoptera: Brentidae)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Applied Entomology and Zoology	6. 最初と最後の頁 485 ~ 492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13355-018-0578-4	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 Himuro Chihiro, Misa Kinjo, Honma Atsushi, Ikegawa Yusuke, Ohishi Tsuyoshi, Kumano Norikuni	4. 巻 13
2. 論文標題 Effects of Larval Diet on the Male Reproductive Traits in the West Indian Sweet Potato Weevils <i>Euscepes postfasciatus</i> (Coleoptera: Curculionidae)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Insects	6. 最初と最後の頁 389 ~ 389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/insects13040389	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okada Koto, Kumano Norikuni	4. 巻 109
2. 論文標題 Reproduction-related interactions and loads induce continuous turn alternation leading to linearity in a terrestrial isopod	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Science of Nature	6. 最初と最後の頁 18#12316;12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00114-022-01795-9	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 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 濱谷杏子・菊池義智・熊野了州
2. 発表標題 共生細菌が宿主昆虫の配偶行動に与える影響
3. 学会等名 第64回日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中愛梨・日室千尋・熊野了州
2. 発表標題 イモゾウムシのメスの再交尾は初回交尾オスの質とサイズに影響される
3. 学会等名 第64回日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 日室千尋・本間淳・池川雄亮・熊野了州
2. 発表標題 イモゾウムシ雌の交尾間隔（不応期）にはパーソナリティがある！？
3. 学会等名 第64回日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 熊野了州・鶴井香織・吉岡伸也
2. 発表標題 アリモドキゾウムシ の構造色多型に関する研究
3. 学会等名 第67回日本生態学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 濱谷杏子・菊池義智・熊野了州
2. 発表標題 イモゾウムシの共生細菌が宿主の交尾行動に与える影響
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 田中愛梨・日室千尋・熊野了州
2. 発表標題 イモゾウムシの雌雄の血縁関係が再交尾に及ぼす影響
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 濱谷杏子・菊池義智・熊野了州
2. 発表標題 共生細菌が宿主昆虫の配偶行動に与える影響
3. 学会等名 第64回日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中愛梨・日室千尋・熊野了州
2. 発表標題 イモゾウムシのメスの再交尾は初回交尾オスの質とサイズに影響される
3. 学会等名 第64回日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 日室千尋・本間淳・池川雄亮・熊野了州
2. 発表標題 イモゾウムシ雌の交尾間隔（不応期）にはパーソナリティがある！？
3. 学会等名 第64回日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 熊野了州・鶴井香織・吉岡伸也
2. 発表標題 アリモドキゾウムシ の構造色多型に関する研究
3. 学会等名 第67回日本生態学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高玉拓生・熊野了州
2. 発表標題 カプトムシのツノ形態に関する研究
3. 学会等名 日本生態学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高玉拓生・熊野了州
2. 発表標題 喧嘩で有利なツノの形はあるのか？
3. 学会等名 個体群生態学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中愛梨・熊野了州
2. 発表標題 血縁関係がイモゾウムシの再交尾に及ぼす影響
3. 学会等名 北海道応用動物・昆虫研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 濱谷杏子・熊野了州
2. 発表標題 イモゾウムシのナルドネラ感染量の交尾成功率への影響
3. 学会等名 北海道応用動物・昆虫研究発表会
4. 発表年 2019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	菊池 義智 (KIKUCHI YOSHITOMO) (30571864)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員 (82626)	
研究分担者	日室 千尋 (HIMURO CHIHIRO) (60726016)	琉球大学・農学部・協力研究員 (18001)	

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
---------	---------