

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21248005

研究課題名（和文） 分子生物学的手法、雄の不妊化、天敵利用による外来侵入アリ 3 種の防除法開発

研究課題名（英文） Methodological studies for the control of three invasive alien ant species using molecular-biological techniques, sterile males and natural enemies

研究代表者

東 正剛 (HIGASHI SEIGO)

北海道大学・大学院地球環境科学研究院・教授

研究者番号：90133777

研究成果の概要（和文）：

継続調査により、アルゼンチンアリの分布域が本州太平洋海岸沿いに拡大していることを確認した。そのうち、横浜で発見した小さな個体群を対象に、アリ道フェロモン成分 Z-(9)-Hexadecenal と市販の殺蟻剤を併用して根絶を試み、成功した。ヒアリの侵入を防ぐため、検疫官でも容易に使える種同定法を開発するとともに、オオタバコガコマユバチが侵入アリの検出に有効であることを確認した。また、ヒアリの核型分析により、台湾などの侵入個体群では 3 倍体などの個体が異常に多いことを見出した。分子生物学的実験に適したトゲオオハリアリを用いてアリの性決定機構を研究し、*feminizer* 遺伝子の発現などに関して重要な知見を得つつある。

研究成果の概要（英文）：

We confirmed that Argentine ants are expanding their distribution along the coastal areas of Pacific Ocean side in Japan, though we succeeded in eradication of one small population in Yokohama using Z-(9)-Hexadecenal as well as a common myrmecocide. To prevent the invasion of RIFA into Japan, we developed methods for identification (using DNA bar coding) and detection (using the parasitoid wasp *Microplitis croceipes*) which can readily be used even by quarantine officers. In the surveys in Taiwan, USA and Argentina, we found that polyploid workers rapidly increased in the countries where RIRA had recently invaded. Using *Diacamma* sp. which is useful for molecular biology, we studied the sex determination mechanism in ants and found some intriguing expression patterns of genes such as *feminizer*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	14,400,000	4,320,000	18,720,000
2010 年度	9,800,000	2,940,000	12,740,000
2011 年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
年度			
年度			
総計	33,600,000	10,080,000	43,680,000

研究分野：動物生態学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：害虫管理、生物的防除、外来侵入アリ

## 1. 研究開始当初の背景

生物多様性の保全と取り組んでいる IUCN（国際自然保護連合）は最も被害の大きな外来侵入生物 100 種を選定し、各国に警戒を喚起しているが、多数の個体からなるコロニーを形成するアリ類からは 5 種類が指定されている。このうち、アルゼンチンアリとヒアリは最も生態系攪乱の著しい侵略的なアリと考えられている。

アルゼンチンアリは 1890 年代に南米からアメリカ合衆国に侵入し、侵略性を増したとされている。第二次世界大戦後、ヨーロッパとオーストラリアにも侵入したが、アジアへの侵入は、1993 年に広島市で確認されたのが最初であった。他方、ヒアリは 1930 年代に南米からアメリカ合衆国に侵入して急速に分布を拡げ、重大な農業・インフラ被害をもたらすとともに、毒針に刺されてアナフィラキシーショックを引き起こす人的被害が相次いだ。そこで 1950 年代からヒア리를根絶するための国家プロジェクトが立ち上げられ、大量の農薬、殺虫剤、殺蟻剤が散布された。1970 年代にはこれによる環境汚染が大きな問題となり、R.カーソン女史の「沈黙の春」に代表されるような環境保全運動が巻き起こった。このため、1980 年代にはこの国家プロジェクトは中止されたが、この間にこのアリは強力な侵略性を獲得してしまった。特に、1970 年代までは 1 コロニーあたり 1 匹の女王しかいない単女王性コロニーがほとんどであったにも拘らず、1980 年代には多女王性コロニーが目立つようになり、産卵能力を有する女王を人為的に運搬してしまう機会が多くなった。恐らくそのためと思われるが、21 世紀に入るとオーストラリア、ニュージーランド、台湾、中国、シンガポールなどの環太平洋諸国でも相次いで侵入が確認された。気候的に比較的不適なニュージーランドでは根絶に成功したと考えられているが、他の国々では莫大な予算をつぎ込んで根絶を図ってきたにも拘らず分布が拡大しており、アメリカ合衆国同様、農薬や殺虫剤の大量散布による環境汚染も深刻な問題となっている。

アルゼンチンアリの生理生態研究は当初アメリカ合衆国で行われたが、1980 年代からはヨーロッパでも盛んに行われるようになり、2000 年代には IUSISI（国際社会性昆

虫学会）の欧州メンバーが EU から多額の研究費を獲得して研究プロジェクトを立ち上げた。これにより、このアリの基礎研究は進んだが、防除法開発などの応用研究は比較的少ない。ヒアリの研究はアメリカ農務省の研究チームが中心となって進めており、全ゲノム解読などの基礎研究に加えて、大豆油を誘引物質とする殺蟻剤の開発、ノミバエなどの天敵利用による生物的防除法の開発などで大きな成果を収めている。しかし、オーストラリア、中国、台湾での研究によると、アメリカで開発された防除法は異なる生態系ではあまり効果的ではないことも明らかになりつつある。

ヒアリはまだ日本に侵入していないが、アメリカ合衆国、中国、オーストラリア、台湾などの主要な貿易相手国が既に汚染されており、侵入も時間の問題とみる専門家が少なくない。また、このアリの同属近縁種であるアカミアリは既に硫黄島に侵入して普通種となっており、最近、硫黄島と小笠原諸島を結ぶ定期船の中でアカミアリの有翅女王が発見され、問題となった。固有種の多い小笠原諸島は外来侵入種に対して脆弱な生態系を有しており、特にアカミアリはウミガメの産卵や発生を妨害することが知られており、その侵入は世界遺産・小笠原の生態系に重大な被害をもたらす可能性を秘めている。

アルゼンチンアリは廿日市市から広島県と山口県の瀬戸内海沿岸域に急速に分布を拡大するとともに、この地域と同じハプロタイプの個体群が約 500km 離れた愛知県田原市で発見された。また、恐らく瀬戸内地域とは異なるハプロタイプの個体群が神戸市、徳島市、岐阜市、静岡市、横浜市、東京都でも次々と発見されており、侵入・分布拡大のルート解明とコントロールが緊急の課題となっている。

## 2. 研究の目的

本研究では、アルゼンチンアリ、ヒアリ（アカミアリを含む）および実験生物として最適なトゲオオハリアリを主な材料として、外来侵入アリ類の侵入阻止と、既に侵入した個体群の制御・根絶を目的として、日本の生態系に合った独創的な総合防除法の開発を目指す。

アルゼンチンアリについては、日本への侵入ルートと分布拡大ルートを明らかにするとともに、生物防除に有効な天敵を探索する。また、比較的最近発見された小さな個体群を選定し、独自の方法によりその根絶を試みる。ヒアリについては、検疫官でも比較的簡単に使用できる同定法を開発するとともに、コンテナなどとともに運び込まれるヒアリの検疫法を検討する。

ヒアリに見られる侵略性の進化機構を明らかにするため、原産地であるアルゼンチン、古い侵入地であるアメリカ合衆国、新しい侵入地である台湾において標本を採集し、核型などの遺伝解析を行う。更に、同じ膜翅目昆虫であるミツバチで性決定の分子機構が明らかとなったことに注目し、分子生物学的研究に適したトゲオオハリアリの性決定機構を解明し、性比コントロールによる独創的な侵入アリ防除法開発のための基礎研究も行う。

### 3. 研究の方法

#### アルゼンチンアリの調査・研究

瀬戸内地域における分布拡大をモニタリングするとともに、日本各地の個体群からDNAサンプルを集め、マイクロサテライトDNA分析により、ハプロタイプ比較を行い、各個体群の侵入ルートや分布拡大ルートを明らかにする。

原産地とされているアルゼンチンにおいてアリ標本（液浸）を採集し、DNAプライマーを用いてボルバキアなどの寄生細菌を探索する。また、広島や神戸において詳細な生態観察を行い、アルゼンチンアリの天敵類を探索する。

近年発見された横浜埠頭の個体群を対象に、根絶を試みる。まず、詳しい分布域調査を行い、市販の殺蟻剤を約10mおきに設置する。その際、道標フェロモンの成分であるZ-(9)-Hexadecenalを浸み込ませたロープをアリ道に沿って張り、アリの採餌活動を妨害することによって殺蟻剤の効果を高める。

#### ヒアリの調査・研究

台湾国立大学のヒアリ研究施設 NFACC (National Fire Ant Control Center)の協力を得、台北周辺においてヒアリの生態調査を行うとともに、環境省等の許可を得て少数のコロニーを北海道大学大学院地球環境科学研究の施設において飼育する。これらのヒアリと、ヒアリに形態が比較的類似している日本産アリ類からDNAを抽出し、ミトコン

ドリア COI 遺伝子の5'末端側約

600bp[<http://www.jboli.org/about/overview>を参照]からヒアリ特異的な配列を増幅できるプライマーを作製し、DNAバーコーディングによるヒアリの簡易同定法を開発する。また、匂いに極めて敏感であることが確認されている寄生蜂オオタバコガコマユバチがヒアリに対してどのような反応を示すか、学習実験を行い、ヒアリ検疫用動物としての有効性を確認する。また、アメリカ合衆国とアルゼンチン（原産地）でもヒアリを採集し、核型などの遺伝解析を行う。

#### アリにおける性決定機構の解明

飼育が容易で、雌雄の発生を人為的にコントロールできるトゲオオハリアリ

*Diacamma* sp.を用いる。まず、モデル生物であるミツバチ（膜翅目）、ショウジョウバエ（双翅目）、コクヌストモドキ（鞘翅目）における性決定遺伝子カスケードを参考にし、プライマーを作製し、*fem*, *tra-2*, *dsx*などの遺伝子を探索し、RT-PCRによって胚発生における発現順序と発現量を明らかにする。次に、雌雄差の大きな触角の発生に着目し、RT-PCRやRNAiなどにより、この器官の性差を引き起こす形態形成遺伝子と性決定遺伝子との関係を明らかにし、性比コントロールによる侵略的アリ類防除法開発のための基礎的知見を得る。

### 4. 研究成果

#### アルゼンチンアリの分布拡大と天敵

廿日市市とその周辺ではアルゼンチンアリの分布が確実に拡大しつつあり（伊藤、未発表）、大竹市や呉市でも新たなコロニーが発見されている。1つのスーパーコロニーと考えられていた神戸市の個体群は少なくとも4つのコロニーから成る可能性があること、ポートアイランドから神戸市内にも侵入したことが明らかとなった（砂村ら、未発表）。また、京都市伏見区、愛知県田原市、横浜港埠頭、東京湾大井埠頭などでも小さな個体群が発見され、「地中海式気候に近い瀬戸内地方に分布は限られる」という当初の楽観論は完全に覆された。マクロサテライトDNA分析の結果、愛知県田原市の個体群は広島個体群から運び込まれた可能性が高い。他の新しい個体群についても分析中であり、ほとんどはいわゆる *Japanese main* に近いが、埠頭個体群は外国からの新しい侵入群である可能性が高いと思われる。

アリを専食することが確認されているクモ、アオオビハエトリをアルゼンチンアリ侵入地と未侵入地で採集し、アルゼンチンアリに対する攻撃行動を観察したところ、未侵入地のクモでは一回でアルゼンチンアリを仕留めるのに対し、侵入地のクモは数回攻撃して仕留めた ( $P < 0.01$ )。アリの数を5個体以上に増やすとクモも攻撃を受け、捕食に失敗することが多いことから、侵入地における複数回攻撃はアリ個体を集団から遠ざけようという適応的な行動と解釈された。いずれにしてもこのクモの捕食効果は高く、生物的防除に使用できる可能性が示唆された。神戸の個体群についてはボルバキアの感染も確認した。原産地アルゼンチンで採集した標本についても感染を確認したが、感染病によってコロニーに重大な影響を及ぼしている証拠は得られていない。しかし、有翅アリの性比が極端に雌に偏ること、雄の中には不妊個体も多いことから、性比の偏り制御による生物的防除に使用できる可能性は残されている。

#### 横浜港埠頭アルゼンチンアリ個体群の根絶実験

2007年に砂村が発見した横浜港本牧埠頭の個体群を対象として、アルゼンチンアリの根絶を試みた。今回殺蟻剤と併用した Z-(9)-Hexadecenal は研究協力者である田付によってニカメイガの性フェロモンの主成分として同定されたものであるが、その後アルゼンチンアリの道標フェロモンの主成分でもあることが判明している。今回は信越化学工業株式会社の協力も得、同社から販売されているローブ状のフェロモン製剤を使用したところ、アルゼンチンアリの巢外活動が攪乱され、アブラムシ飼育などの採餌活動が阻害された。恐らくその為と思われるが、殺蟻剤だけを使用した場合よりも殺蟻効果が高く、急速にコロニーサイズが縮小し、平成22年までにアルゼンチンアリが見られなくなった。平成23年夏と24年春にも生息の有無を調査したが、全く見られず、根絶に成功したと考えられる。アルゼンチンアリ個体群の根絶は世界各地で試みられてきたが、これまで成功した例はなく、今回の実験は道標フェロモンの併用が如何に効果的であるかを示している。

#### ヒアリの簡易同定法と検疫法の開発

台湾産ヒアリと日本産アリ類50種についてCOI遺伝子の塩基配列を比較したところ、約200bpのヒアリ特異的配列を見出し、プライマーを作製した。これを用いると、フロリダ、

オーストラリア、ニュージーランドの侵入ヒアリ、アルゼンチンの原産地ヒアリより抽出したDNAも増幅できること、また、その他のアリ類では増幅しないことを確認した。DNAバーコーディングによる同定用プライマーとして登録するには、DNAを抽出したアリ個体を標本として残すことが義務付けられている。そのため、DNAeasy (Qiagen)のキットで最初の標本の分解(ホモジェナイズ)を行わず、ProteinaseKを加えて2日間57°Cで煮込むことにより、アリの体を破壊せずにPCR増幅可能なDNAを得る方法に改良した。

九州大学農学部・高須准教授の協力を得、オオタバコガコマユバチをヒアリ検疫動物として使えるか否かを検討した。アリ100匹と報酬(砂糖水)を与え、報酬付き学習試験を行なったところ、約40分の学習試験後、オオタバコガコマユバチはわずか1匹のヒアリだけでもそのにおいを認識し、発見した。台湾では犬をヒアリ検疫に使用しているが、この寄生蜂の飼育と学習実験は遥かに簡便で低コストであり、ヒアリ検疫に使用できると思われる。

#### ヒアリの核型

台湾でヒアリ25個体の染色体数を調べたところ、最頻値が二倍体( $2n = 32$ )で40%、次いで単数体の37%、異数体17%と明確なピークを示さず、高い変異が観察された。また、18S rDNAのFISHマッピングの結果、シグナルが雌雄ともに1-11個観察され、高い変異を示した。アメリカのフロリダ州で80個体を解析した結果、台湾に比べ二倍体の頻度が有意に多く(約62%)、単数体、異数体の頻度が少なかった。18S rDNAのFISHマッピングの結果は台湾個体群同様にシグナル数や位置に大きな変異が認められた。

これらの結果を受け、原産地個体群の染色体数変異を明らかにするために、アルゼンチン共和国ブエノスアイレス市内の自然保護区、コスタネラ・スー自然保護区、イグアス国立公園周辺でヒアリを採集し、130個体を解析した。その結果、原産地に最も近いイグアス国立公園周辺の個体群では、二倍体が最頻値で、約76%であった。これに対し、国内もしくは他の国からの移入個体群である可能性が高いブエノスアイレスでは、最頻値は二倍体であったものの、3倍体や4倍体の細胞も低頻度ながら観察された。また、最頻値の比率は約63%とフロリダにおける最頻値頻度とほぼ同じであり、統計的にイグアス個体群と有意な差があった。また、18S rDNA

をプローブとした FISH 解析では、ブエノスアイレス個体群ではシグナルが多様な染色体上で観察されたのに対し、イグアス個体群では2対の染色体上に安定して検出された。今回新たにテロメア配列をプローブに FISH 解析を行ったところ、特に台湾個体群ではテロメア配列のシグナルが特定の1対の染色体全体に分布していることが明らかになった。アルゼンチン南部では、ヒアリの種多様性が高く、種間交雑も示唆されている。種間雑種形成による遺伝的な多様性創出は塩基配列の多様性のみならず、染色体数や染色体上の遺伝子分布などにも影響を及ぼしていると考えられた。

#### アリにおける性決定遺伝子カスケードと性的二型の分子基盤

アリのゲノム情報をもとに性決定遺伝子のプライマーを作製し、トゲオオハリアリより *feminizer* 遺伝子4タイプ、*transformer-2* 遺伝子1タイプ、*doublesex* 遺伝子2タイプを得た。発現順序は *fem*→*tra-2*→*dsx* であり、アリの最上流性決定遺伝子は *feminizer* であることが強く示唆された。また、*doublesex* のうち2タイプは雌型 (*dsxF*)、1タイプは雄型 (*dsxM*) であった。

次に、雌雄で顕著な形態差が見られる触角の発生過程を観察するとともに、性的二型に関わる遺伝子を探索した。まず、触角形成過程を蛹期から幼虫期へと遡ると、4齢幼虫期に始まり、ほぼ完成することが明らかとなった。そこで、4齢幼虫の触角で発現する遺伝子を RT-PCR によって探索した。モデル生物の研究成果を参考に、候補遺伝子として *hth*, *dac*, *Dll*, *Krn*, *esg*, *exd*, *ss* の発現量を調べた。これら7遺伝子のうち、*ss* は最も触角特異的に発現し、触角形成に深く関わっていることが示唆された。*Dll* は触角特異的であると同時に、雄での発現量が多く、13節からなる雄の長い触角形成に関わっていることが示唆された。雌の触角(12節)は長い第一節(柄節)が特徴的であり、ショウジョウバエなどでは触角の根元で主に発現する *hth* の関わりが期待されたが、この遺伝子の発現量は雌でやや多いものの、統計的には雄の発現量と有意差が認められなかった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Ishikawa Y, Miura T (2012) Hidden aggression in termite workers: plastic defensive behaviour dependent upon social context. *Anim Behav* 83: 737-745.
- ② Gotoh H, Cornette R, Koshikawa S, Okada Y, Lavine LC, Emlen DJ, Miura T (2011) Juvenile hormone regulates extreme mandible growth in male stag beetles. *PLoS One* 6(6): e21139.
- ③ Watanabe D, Gotoh H, Miura T, Maekawa K (2011) Soldier presence suppresses differentiation through a rapid decrease of JH in the termite *Reticulitermes speratus*. *J Insect Physiol* 57: 791-795.

[学会発表] (計5件)

- ① 坂本洋典 Use of synthetic trail pheromones. 2010 International Invasive Ant Workshop. 2010年4月28日. Darwin, Australia
- ② 坂本洋典 Rapid predation of Japanese myrmecophagous jumping spider *Silver vitiaties* against the Argentine ant *Linepithema humile*. International union for the study of social insects XVI Conference. 2010年8月12日. Copenhagen, Denmark
- ③ 石川由希・青沼仁志・佐々木謙・三浦徹 兵隊シロアリの攻撃性はチラミンによってもたらされる. 日本動物学会 第82回旭川大会 2011. 2011.09.21-23 旭川
- ④ 村上貴弘, Unusual chromosome numbers and polyploidy in invasive fire ant populations, 第59回日本生態学会、2012年3月18日大津市(滋賀県) Organized Session のオーガナイザー
- ⑤ 佐藤一樹、坂本洋典、平田真規、鎌田頌子、東正剛、村上貴弘 Kin recognition behaviors and genetic diversity of invasive ant, *Linepithema humile* in Japan and Argentina. 第59回日本生態学会、2012年3月19日大津市(滋賀県)

[図書] (計2件)

- ① 東正剛、辻瑞樹、海游舎、社会性昆虫の進化生物学、2011、477
- ② 三浦徹、海游舎、社会性昆虫の進化生物学、2011、477

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)、
- 取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

東 正剛 (HIGASHI SEIGO)  
北海道大学・大学院地球環境科学研究院・  
教授  
研究者番号：90133777

### (2) 研究分担者

三浦 徹 (MIURA TORU)  
北海道大学・大学院地球環境科学研究院・  
准教授  
研究者番号：00332594

村上 貴弘 (MURAKAMI TAKAHIRO)  
北海道教育大学・教育学部・准教授  
研究者番号：40374706

### (3) 連携研究者

辻 瑞樹 (TSUJI MIZUKI)  
琉球大学・農学部・教授  
研究者番号：2022135

伊藤 文紀 (ITO FUMINORI)  
香川大学・農学部・教授  
研究者番号：50260683

尾崎 まみこ (OZAKI MAMIKO)  
神戸大学・理学部・教授  
研究者番号：00314302

五箇 公一 (GOKA KOICHI)  
独立行政法人国立環境研究所・環境リス  
ク研究センター・主任研究員  
研究者番号：90300847

佐竹 暁子 (SATAKE AKIKO)  
北海道大学・大学院地球環境科学研究院・  
准教授  
研究者番号：70506237