

## 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25年 3月31日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21380037

研究課題名（和文） 病原微生物に対する昆虫の社会システム

研究課題名（英文） Defence systems of social insects to entomopathogenic microorganisms

研究代表者

清水 進 (SHIMIZU SUSUMU)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：20187454

研究成果の概要（和文）：社会性昆虫であるシロアリ類は昆虫病原性糸状菌に対して単独飼育では極めて感受性であるが、集団飼育すると抵抗性になる。本研究ではその抵抗性になる機構について調査した結果、ネストメイトによる相互グルーミングがこの抵抗性になることの機構に関与しており、この相互グルーミング（社会行動）は触角によりネストメイト上の昆虫病原性糸状菌が化学的に認知されることより誘導されることを見出した。したがって、ネストメイトに病原菌が付着することにより、それに対する昆虫の社会システムが活性化されることになる。

研究成果の概要（英文）：Termites, *Coptotermes formosanus* Shiraki, reared individually, were highly susceptible to entomopathogenic fungi, while termites reared in groups were highly resistant. Our results suggested that self-grooming behavior is less effective, but mutual grooming is very effective in the removal of conidia from cuticles of their nestmates. Grooming behavior can at times lead to attack and cannibalism behaviors. The results of this study also indicated that contact with a pathogen induces behavioral changes in termite disease-prevention behaviors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2012年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：昆虫病理学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：社会性昆虫、病原微生物、病気抵抗性

### 1. 研究開始当初の背景

病原微生物に対するシロアリの集団（コロニー）レベルの防御に関する研究が始まったのは最近の10年間である。Bouciousらは社会性行動（相互グルーミング）が病気抵抗性に著しく関与していることを最初に報告した。その後、TranielloとRosengaus

のグループが精力的に研究し、病原菌に対する警戒行動(alarm behavior)や集団における免疫作用の増加などを発表している。同グループによるとコロニー防衛システムでは次の4点が重要とされている。□個体レベルの免疫(individual immunity)、□衛生行動(hygienic behavior)、□相互グルー

ミング(mutual grooming)、□構成メンバーの老若比(demography)。しかし、いずれも現象論に留まりそのメカニズムの究明までには至っていない。

## 2. 研究の目的

現在、地球上で記載されている動物種の約72%が昆虫である。種数では全昆虫の2%にすぎない社会性昆虫が、生物量では5割以上となり、地球上で最も繁栄しているともいえる。繁栄した要因として社会システムを獲得したことを挙げることができるが、病原微生物に対してそのシステムがどのように機能しているかについては不明の点が多い。本研究は、病原微生物に対する社会システム(社会性昆虫特有の防御メカニズム)の全体像、とくに相互グルーミング(社会行動)を明らかにすることを目的としている。

## 3. 研究の方法

①社会性行動による抵抗性の獲得 T1 から T10 株の各濃度の分生子懸濁液(分生子数  $10^8$  から  $10^2$ /ml)を接種したイエシロアリ職蟻を、単独飼育(1頭飼育)または集団飼育(5頭および10頭飼育)で飼育し半数致死濃度(LC<sub>50</sub>値)を Reed and Muench (1938)の方法に基づき算出した。また、T8株の単独飼育区については(LC<sub>90</sub>値)についても算出した。さらに、各種処理により社会性行動を制御した場合および多量の分生子を処理した場合のネストメイトの行動変化についても検討を加えた。

②単独飼育での感受性を利用した新しい分離法の確立 上記の結果より、単独飼育した場合シロアリは昆虫病原性糸状菌への感受性が高く昆虫病原性糸状菌の釣り出しに相当であると考えられるので、従来使用されてきたハチノスツズリガによる釣り出し法と比較検討した。

### ③集団飼育における病原菌の動向

*Metarhizium anisopliae* T8株を用いて、イエシロアリ職蟻による分生子接種個体から非接種個体への分生子の水平伝播および除去の定量を行った。  $1.0 \times 10^8$ /ml に調整した分生子懸濁液で処理し、さまざまな処理個体と非処理個体の比率で混合飼育を行った(10:0, 5:5, 7:3および1:9)。接種直後、3時間後、6時間後、12時間後および24時間後に、処理個体と非処理個体を3頭ずつ取り出し、体表付着分生子数を定量した(CFU/頭)。両菌とも、5:5区のみ摘出した消化管内の懸濁液を培養し、消化管内に取り込まれた分生子の数を調査した。全区2回ずつ行い、結果の再現性を確かめた。また、*M. anisopliae* T8株において別区を設けて接種対非接種5:5区、3:7区および1:9区の7日間での死亡率を調査した。

## 4. 研究成果

### ①社会性行動による抵抗性の獲得

*M. anisopliae* T8株に対してイエシロアリは集団(5頭および10頭飼育)で相互グルーミングを行うことで抵抗性を高め、単独では著しく感受性であった(図1)。この傾向は *Metarhizium* 属糸状菌のみでなく *Paecilomyces* 属および *Beauveria* 属糸状菌においても認められた。

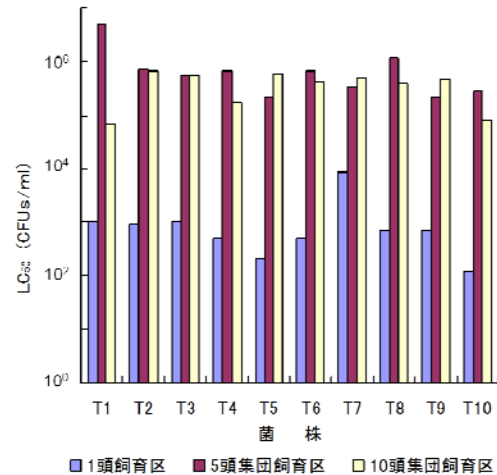


図1 *M. anisopliae* T8株のイエシロアリに対する病原力

集団飼育で認められる抵抗性の向上は化学的処理(イミダクロプリド)により行動を制御することにより消失した。同様に触角を切除した場合にも消失した。さらに、分生子の揮発成分に触角が電気生理的に反応することが判明した。したがって、ネストメイトに病原菌が付着することにより、それに対する昆虫の社会システムが活性化されることになる。

一方、接種個体と非接種個体を区別するため分生子接種を予定する個体をナイルブルーによる個体染色を行った。多量の分生子を接種した場合、ネストメイトにより攻撃を受け死亡する個体が認められた(図2)。

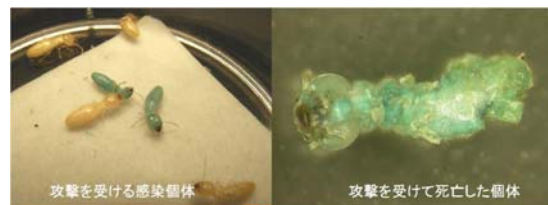


図2 分生子非接種個体の分生子付着個体(体色:ブルー)への攻撃

②単独飼育での感受性を利用した新しい分離法の確立 上記の結果を考慮してシロアリを用いた昆虫病原性糸状菌の釣り出し法の有効性を評価するため、ヤマトシロアリを

用いて 31 の土壌サンプルから昆虫病原性糸状菌の釣り出しを行った。その結果、少なくとも *Aspergillus*, *Beauveria*, *Fusarium*, *Lecanicillium*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Pochonia* および *Verticillium* の 8 属の糸状菌が分離された。大部分の糸状菌が肉座菌目 (Hypocreales) に属し、*Metarhizium* 属が最も高頻度で検出された (図 3)。

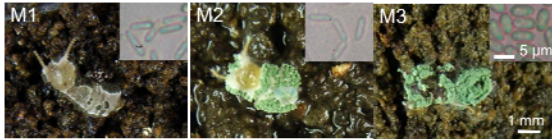


図 3 ヤマトシロアリを用いた土壌からの昆虫病原性糸状菌の分離

上記の結果とハチノスツズリガの結果と比較した場合、*Beauveria* 属と *Metarhizium* 属は土壌中の主要な昆虫病原性糸状菌であり、両属ともにハチノスツズリガを用いた釣り出し法では高い頻度で土壌より検出される。ハチノスツズリガを用いた釣り出し法による *Beauveria* 属と *Metarhizium* 属の検出率は、カナダでは 61.2%と 66.7% (Bidochka et al., 1998)、中国では 47.9%と 48.3% (Sun et al., 2008) およびイタリアでは 64.3%と 29.1% (Quesada-Moraga et al., 2007) であった。しかし、本研究におけるヤマトシロアリによる釣り出し法では *Beauveria* 属の検出率が低かった。しかし、多種多様な昆虫病原性糸状菌を分離するには有効な方法であることが判明した。

### ③集団飼育における病原菌の動向

集団飼育における動向とその影響を詳細に調査するため T8 株の病原力を調査した。イエシロアリ職蟻を単独飼育した場合の半数致死量 (LD<sub>50</sub> 値) (CFUs/頭) は 5.8 であり、90%致死量 (LD<sub>90</sub> 値) (CFUs/頭) は  $8.1 \times 10^1$  で、数個の分生子の付着によりシロアリを致死させることが明らかになった (表 1)。なお、集団飼育した場合にはイエシロアリの抵抗力は約 100 倍増強される。

表 1 *M. anisopliae* T8 株のイエシロアリに対する病原性

LD <sub>50</sub> 値 (CFUs/頭)	LD <sub>90</sub> 値 (CFUs/頭)
5.8	$8.1 \times 10^1$

### イエシロアリ個体間における水平伝搬

全頭接種区 (図 4, A) において付着分生子数は 24 時間後に約 100 分の 1 に減少した。しかし、菌が体内に侵入する 24 時間後でも、 $10^2$  個以上の分生子が付着しており、数日後に全頭が死亡した。

接種個体 5 頭:非接種個体 5 頭の区 (図 4, B) において、接種個体での付着分生子数の減少と、水平伝播による非接種個体への付着が

確認された。非接種個体の付着量はおよそ 3 時間後に最大となり、その後減少していった。しかし、24 時間後でも、両者には致死量を上回る分生子が付着しており (表 1; 図 4, B)、5 日目で接種個体と非接種個体の両者とも全滅した。3:7 区では、5:5 区と同様の傾向が認められたものの、非接種個体への水平伝播量は 5:5 区を下回っていた (図 4, C)。5 日以内に接種個体 3 頭が全滅し 7 日後には非接種個体 7 頭も全滅した。

1:9 区においても、非接種個体への水平伝播量は 6 時間で最大を迎えたが、12 時間後には 0 個まで減少した。7 日後における非接種個体の死亡率 2 割であった。しかし、水平伝播量の最大時に (混合飼育 3~6 時後)、非接種個体を化学的処理 (低濃度イミダクロプリド処理) または物理的処理 (単独飼育) により社会性行動を抑制した結果、1:9 区においても非接種個体の全てが死亡した (図 5)。

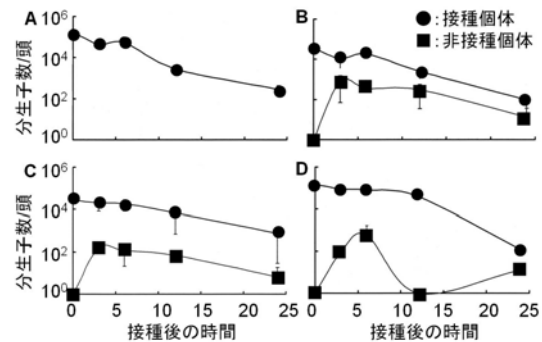


図 4 イエシロアリ体表における *M. anisopliae* T8 分生子の付着 分生子接種個体と非接種個体の混合飼育比率: A(10:0), B(5:5), C(3:7), D(1:9)

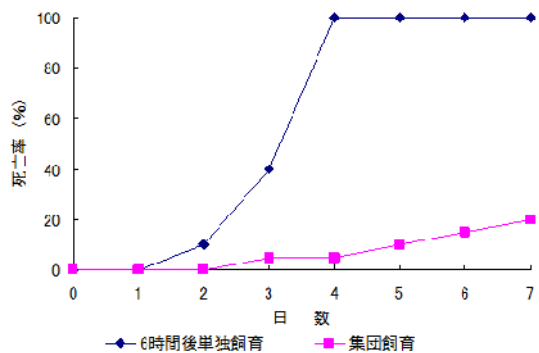


図 5 分生子接種個体と非接種個体の混合 (1:9) で 6 時間飼育後、単独および集団飼育した場合の死亡率

相互グルーミングはネストメイトの体表付着分生子の除去と同時に分生子の水平伝播に関与している。水平伝播による非接種個体への分生子の蔓延は、接種個体の比率に依存し 1:9 区では全個体を感染させることができなかったが、全区に共通して 3~6 時間で伝播量が最大値となった。集団飼育では絶

滅しない飼育比率の区(接種：非接種=1：9)に、致死量に満たない6 ppmのイミダクロプリドを投与することで集団は絶滅した。シロアリ用イミダクロプリド製剤であるハチクサン水和顆粒(Bayer CropScience)のメーカー推奨適性使用濃度が0.1% (1000 ppm)であることから、この防除方法は化学殺虫剤の削減に寄与できることを示している。しかし、様々な役割を担う多数の個体から形成され、まるで一つの個体であるかのように振る舞う生物の集団であるシロアリのコロニーを考慮した場合、本研究はシャーレ内の実験であり、抗菌物質を含んだ唾液や排泄物などで作られた巣材や他のカストや野外の様々な影響を考慮していない。今後更に個体数を増やした実験や野外コロニーにより近い条件での実験を行うことで、シロアリの行動、微生物的防除資材および化学農薬の相乗効果を誘導する効率的な防除法が確立されることを期待したい。

#### 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7件)

- (1) Yanagawa, A., Fujiwara-Tsuji, N., Akino, T., Yoshimura, T., Yanagawa, T., and Shimizu, S. Odor aversion and pathogen-removal efficiency in grooming behavior of the Termite *Coptotermes formosanus* PLOS ONE October 2012 | Volume 7 | Issue 10 | e4741
- (2) Yanagawa, A., Fujiwara-Tsuji, N., Akino, T., Yoshimura, T., Yanagawa, T., and Shimizu, S. Musty odor of entomopathogens enhances disease-prevention behaviors in the termite *Coptotermes formosanus* Journal of Invertebrate Pathology, 108, 1-6, 2011
- (3) Yanagawa A., Fujiwara-Tsujii, N., Akino, T., Yoshimura T., Yanagawa, T., Shimizu, S. Behavioral changes in the termite, *Coptotermes formosanus* (Isoptera), inoculated with six fungal isolates Journal of Invertebrate Pathology, 107, 100-106, 2011
- (4) Nishi, O., Hasegawa, K., Iiyama, K., Yasunaga-Aoki, C., and Shimizu, S. Phylogenetic analysis of *Metarhizium* spp. isolated from soil in Japan Applied Entomology and Zoology, 46, 301-309, 2011
- (5) Yanagawa, A., Yokohari, F., and Shimizu, S. Influence of fungal order on grooming behavior of the termite, *Coptotermes formosanus* Journal of Insect

Science, 10, available online: [insectscience.org/10.141](http://insectscience.org/10.141), 2010

- (6) Nishi, O., Iiyama, K., Yasunaga-Aoki, C., and Shimizu, S. Virulence of *Metarhizium anisopliae* var. *majus* isolated from soils against termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki Japanese Journal of Environmental Entomology and Zoology. 21, 29-35, 2010
- (7) Yanagawa, A., Yokohari, F., and Shimizu, S. The role of antennae in removing entomopathogenic fungi from cuticle of the termite, *Coptotermes formosanus*. Journal of Insect Science, 9, 1-9, 2009

[学会発表] (計27件)

- ① Yanagawa, A., Fujiwara-Tsuji, N., Akino, T., Yoshimura, T., and Shimizu, S. Sensitivity of behavior to pathogen-related order in the termite, *Coptotermes formosanus* International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control and 45th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, P75, Centro de Convenciones de la UCA Puerto Madero, Buenos Aires, Argentina, 2012. 8.6
- ② Nishi O., Iiyama, K., Yasunaga-Aoki, C., and Shimizu, S. Host-dependent lineage diversification of Scarabaeidae-specific pathogen *Metarhizium majus* International Congress on Invertebrate Pathology and Microbial Control and 45th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, P60, Centro de Convenciones de la UCA Puerto Madero, Buenos Aires, Argentina, 2012. 8.6
- ③ Nishi O., Iiyama, K., Yasunaga-Aoki, C., and Shimizu, S. Pathogenicity of *Metarhizium majus* (Deuteromycotina; Hyphomycetes) to Scarabaeidae insect larvae. The 8th International AFAS Joint Symposium between Japan and Korea, P107, Yonago, Tottori, 2011. 11. 16
- ④ Yanagawa, A., Fujiwara-Tsuji, N., Akino, T., Yoshimura, T., and Shimizu, S. The effect of pathogen odor signals on behavior of termites, *Coptotermes formosanus* International Conference on Invertebrate Pathology and Microbial Control, OECD Symposium on Disease in Aquatic Crustaceans & 44th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, P8, Halifax, Nova Scotia, Canada, 2011. 8. 10

⑤Nishi O., Iiyama, K., Yasunaga-Aoki, C., and Shimizu, S. Phylogenetic and pathogenic divergence within *Metarhizium majus* lineage International Conference on Invertebrate Pathology and Microbial Control, OECD Symposium on Disease in Aquatic Crustaceans & 44th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, pp. 55-56, Halifax, Nova Scotia, Canada, 2011.8.10

⑥西 大海・飯山和弘・青木智佐・清水 進 シロアリを用いた釣り出し法による昆虫病原性糸状菌の土壌からの分離 日本蚕糸学会第64回東北支部・第66回中部支部・第62回東海支部・第76回関西支部・第66回九州支部合同大会 昆虫機能・利用学術講演会 浦添市てだこホール 沖縄 2010.11.15

⑦Nishi O., Iiyama, K., Yasunaga-Aoki, C., and Shimizu, S. Isolation of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* from soil by bait method with termite. TRG 7, 2010 Pacific Rim Termite Research Group, pp.20-23, Singapore, 2010.3.1

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

清水 進 (SHIMIZU SUSUMU)  
九州大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：20187454

### (2) 研究分担者

高木 正見 (TAKAGI MASAMI)  
九州大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：20175425  
青木 智佐 (AOKI CHISA)  
九州大学・大学院農学研究院・准教授  
研究者番号：20264103  
飯山 和弘 (IIYAMA KAZUHIRO)  
九州大学・大学院農学研究院・助教  
研究者番号：70325489