

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：82105

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22688012

研究課題名(和文) 寄生細菌“ボルバキア”を利用したマツノマダラカミキリの生殖機能攪乱技術の確立

研究課題名(英文) Development of technique to disrupt the reproductive function of *Monochamus alternatus* using an endosymbiotic bacterium, *Wolbachia*

研究代表者

相川 拓也 (Aikawa, Takuya)

独立行政法人森林総合研究所・東北支所・主任研究員

研究者番号：90343805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 7,500,000円、(間接経費) 2,250,000円

研究成果の概要(和文)：ボルバキアは昆虫類を含む節足動物の細胞内に生息している細菌で、宿主に生殖異常を引き起こす細菌として知られている。本研究では、アズキゾウムシに共生し宿主に細胞質不和合を引き起こすボルバキアをマツノマダラカミキリに人為的に注入することにより、マツノマダラカミキリの生殖機能にどのような影響が生じるのかを明らかにするための研究を行った。ボルバキア注入個体と非注入個体との交配実験を行ったところ、注入雄×非注入雌との交配により生じた卵からの孵化率だけが著しく低くなった。この結果から、アズキゾウムシ由来のボルバキアはマツノマダラカミキリに対しても細胞質不和合を引き起こすことが示された。

研究成果の概要(英文)：Wolbachia are endosymbiotic bacteria in arthropods including insects, and capable of manipulating host reproduction by causing cytoplasmic incompatibility, parthenogenesis, male killing or feminization. In this study, effect of artificial injection of the Wolbachia of *Collosobruchus chinensis* (cause cytoplasmic incompatibility to the host) to *Monochamus alternatus* was investigated. Mating experiments between Wolbachia-injected individuals and non-injected individuals revealed that only the hatching rate of eggs produced by mating of injected males x non-injected females decreased remarkably. This means that the Wolbachia of *C. chinensis* caused cytoplasmic incompatibility to *M. alternatus*.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：マツノマダラカミキリ ボルバキア マイクロインジェクション 生殖異常 マツ材線虫病

1. 研究開始当初の背景

ボルバキアは昆虫類を含む節足動物の細胞内に寄生する細菌で、宿主昆虫に生殖異常をもたらすことで知られている。その生殖異常にはいくつかタイプがあり、たとえば、細胞質不和合(次世代を作らせない)、雄殺し(雄に発育すべき卵を孵化させない)、そして雄の雌化(遺伝的には雄でも雌に発育させる)などが代表的な生殖異常の例として挙げられる。その中で最も注目されているのが細胞質不和合で、この現象を害虫に対する防除素材として利用する試みが行われている。

マツノマダラカミキリはマツ材線虫病の病原体であるマツノザイセンチュウを媒介する森林害虫である。先行研究により、マツノマダラカミキリにはボルバキアが感染していないものの、マツノマダラカミキリのゲノム上にはボルバキアの遺伝子が大規模に転移している(遺伝子の水平転移が起こっている)ことが明らかにされていた。これは、昔、ボルバキアがマツノマダラカミキリに感染していたことを示している。さらに、マツノマダラカミキリに転移したボルバキアの遺伝子は、アズキゾウムシから検出されるボルバキアの遺伝子と最も近縁であることが明らかにされていた。

2. 研究の目的

マツノマダラカミキリが昔感染していたボルバキアと最も近縁な関係にあるアズキゾウムシのボルバキアであれば、マツノマダラカミキリに定着させることができるのではないかと。そして、もし、ボルバキアをマツノマダラカミキリに導入することで細胞質不和合が起こるのであれば、他の衛生害虫や農業害虫と同様にマツノマダラカミキリでもボルバキアを生物的防除素材として利用できるかもしれない。そのような発想から、本研究では、アズキゾウムシのボルバキアをマツノマダラカミキリに人為的に接種することで、マツノマダラカミキリにどのような生殖異常が起こるかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マツノマダラカミキリの蛹に対するボルバキアの人為的注入がマツノマダラカミキリの羽化に及ぼす影響と注入個体およびその次世代個体のボルバキア感染の有無:

小豆で飼育したアズキゾウムシの蛹を小豆内から大量に採集し、それらをすりつぶしてボルバキア溶液を作成した。そのボルバキア溶液を人工飼料上で飼育したマツノマダラカミキリの蛹 78 頭にマイクロインジェクション法を用いて注入した。その対照区として、PBS を 28 頭の蛹に注入しそれらの羽化率を調べた。また、ボルバキアを注入した個体、およびその注入雌から生まれた次世代の幼虫および成虫の精巣・卵巣におけるボルバキアの感染の有無を PCR 法により調査した。

(2) マツノマダラカミキリの卵に対するボルバキアの人為的注入がマツノマダラカミキリの発育に及ぼす影響と注入個体およびその次世代幼虫のボルバキア感染の有無:

(1)と同様にアズキゾウムシの蛹を小豆から採集し、それらからボルバキア溶液を作成した。交尾済みのマツノマダラカミキリの雌成虫にアカマツの丸太を与え、翌日に丸太から卵を回収しシャーレに並べ、各卵にマイクロインジェクション法でボルバキア溶液を注入した。その後孵化した幼虫は人工飼料に入れ、成虫に発育するまで飼育した。発育の途中で死亡した個体については適宜人工飼料から取り出し、PCR 法を用いてボルバキアの感染の有無を調べた。成虫まで発育した個体は雄成虫と雌成虫を交配させ、その孵化幼虫がボルバキアに感染しているかどうかを調査した。その後虫体を解剖し、卵巣あるいは精巣を摘出して、それらの組織におけるボルバキアの感染の有無を調べた。

(3) ボルバキアを注入したマツノマダラカミキリ個体と注入しなかったマツノマダラカミキリ個体を用いた交配実験による孵化率の比較:

(1)で得られた、ボルバキア注入成虫と対照として PBS を注入した成虫(非ボルバキア注入成虫)を用いて、4 つの組み合わせ(注入雄×非注入雌、非注入雄×注入雌、注入雄×注入雌、非注入雄×非注入雌)を 5 ペアずつ作り、それぞれ交配させた。それらの雌にアカマツ丸太を与え産卵させ、翌日その丸太の樹皮下から卵を採取し水を含んだろ紙入りのシャーレに並べて孵化させた。その孵化率を 4 つの組み合わせ間で比較し、孵化率に差が出るかどうか調査した。

4. 研究成果

(1) ボルバキアを注入した個体では、78 頭中 60 頭が羽化に成功した。一方、PBS を注入した個体では、28 頭中 26 頭が羽化に成功した。このようにマツノマダラカミキリの羽化率は、ボルバキア注入個体では 78%、ボルバキア非注入個体では 93% となり(有意差無し)、両者とも高い確率で蛹から成虫へと発育できたことから、ボルバキアの人為的注入はマツノマダラカミキリの羽化にそれほど大きな影響を及ぼさなかったと推測された。しかし、ボルバキア注入個体では、羽化はするものの、奇形の成虫の発生割合が少し高かった。ボルバキアを注入後羽化に成功した成虫のボルバキア感染率を調べた。その結果、成虫の生存期間にかかわらず羽化に成功した 60 頭(雄 30 頭、雌 30 頭)すべてからアズキゾウムシのボルバキア遺伝子が検出され、注入したボルバキアがマツノマダラカミキリの成虫個体に定着していることが示唆された。このように、マツノマダラカミキリの蛹に注入したボルバキアはマツノマダラ

カミキリが成虫になった後も除去されることなく虫体内で安定的に生息できる（定着できる）ことが明らかとなった。

次に、ボルバキアを注入した雌成虫から次世代の個体にボルバキアが移るかどうか調査した。ボルバキアを注入した雌が産んだ卵から孵化した孵化幼虫 183 頭について、PCR 法により感染の有無を調べたところ、感染している幼虫は 1 頭もなかった。また、その孵化幼虫を人工飼料上で成虫に発育させた 45 頭についても、各成虫から精巣あるいは卵巣を取り出し、上記と同様に PCR 法を用いてボルバキアの感染率を調べたところ、どの個体からもボルバキアは検出されなかった。このように、アズキゾウムシのボルバキアをマツノマダラカミキリの蛹に注入した場合、注入した個体にはボルバキアが安定的に定着するものの、次世代の個体にはボルバキアは全く移らないことが明らかとなった。

(2) ボルバキアを注入した卵 367 個のうち約 50% が孵化に成功した。その孵化幼虫を人工飼料に入れ飼育したところ、飼料の中に潜ってそのまま死亡してしまうケースが多発し、それらの個体についてはボルバキア感染の有無は調べられなかった。途中まで発育が進んだ後死亡した若齢幼虫 23 頭についてボルバキアの感染率を調べた結果、22 頭がボルバキアに感染していた。また、終齢幼虫まで発育したが蛹化あるいは羽化できなかった 19 頭の個体についても同様に感染率を調べたところ、すべての個体からボルバキアが検出された。一方、成虫まで発育できた 12 個体のうちボルバキアに感染していた個体は 1 頭（雌）だけであり、その雌個体が産んだ卵から孵化した幼虫は全くボルバキアに感染していなかった。このように、マツノマダラカミキリの卵にアズキゾウムシのボルバキアを注入した場合、人工飼料内での死亡によりボルバキア感染の有無を調べられなかった孵化幼虫を除き、ボルバキアに感染した個体のほとんどは発育の途中で死亡あるいは発育が止まってしまい、成虫まで発育できないことが明らかとなった。

(3) 注入雄×非注入雌の組み合わせでは、合計 232 個の卵が、非注入雄×注入雌の組み合わせでは 170 個の卵が、注入雄×注入雌の組み合わせでは 148 個の卵が、非注入雄×非注入雌の組み合わせでは 239 個の卵が得られた。それらの孵化率を比較してみると、の組み合わせでは、およそ 80% の孵化率だったのに対し、の組み合わせでは、約 30% の孵化率にとどまった。アズキゾウムシのボルバキアは、宿主であるアズキゾウムシに細胞質不和合を引き起こすことが知られている。細胞質不和合はボルバキアに感染している雄と感染していない雌との間で引き起こされる現象であることから、本研究で得られた結果、すなわち、注入雄×非注入

雌の組み合わせでのみ孵化率が低下したという現象は、アズキゾウムシ由来のボルバキアによってマツノマダラカミキリに引き起こされた細胞質不和合現象であると言っただろう。しかし、今回の結果は、ボルバキアを注入したものの、マツノマダラカミキリの生殖腺にきちんと定着していたのかどうかまでは調べられなかった。(1) の結果で示されたように、次世代の個体にボルバキアが移っていないことを考慮すると、生殖腺まではしっかりと定着できていない可能性が高い。生殖腺に確実にボルバキアを定着させ、次世代への移行も可能になれば、孵化率はさらに低下するものと期待できる。今後の課題として、マツノマダラカミキリへ注入したボルバキアが次世代へ確実に移行する「ボルバキア感染系統」を作ることが重要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Aikawa T., Nikoh N., Anbutsu H., Togashi K. (2014) Prevalence of laterally transferred *Wolbachia* genes in Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae). *Applied Entomology and Zoology* 49: 337-346. (査読有)(DOI 10.1007/s13355-014-0256-0)

相川拓也 (2012) マツノマダラカミキリに残る共生細菌の痕跡. 日本森林学会誌 94: 292-298. (査読有)
(https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjfs/94/6/94_292/_pdf)

相川拓也・安佛尚志・二河成男・菊地泰生・柴田洋・深津武馬 (2010) 生物の種を超えた遺伝子の転移 - マツノマダラカミキリの常染色体上に共生細菌ボルバキアの遺伝子を発見 - . 平成 22 年度版森林総合研究所成果撰集: 62-63. (査読無)
(<http://www.ffpri.affrc.go.jp/pubs/seikasenshu/2010/documents/p62-63.pdf>)

相川拓也 (2010) 種の壁を越えた遺伝子の転移 - マツノマダラカミキリの染色体上に共生細菌ボルバキアの遺伝子を発見 - . 季刊森林総研 9: 14-15. (査読無)
(<http://www.ffpri.affrc.go.jp/pubs/kikan/documents/kikanffpri-9.pdf>)

〔学会発表〕(計 5 件)

相川拓也・安佛尚志・今藤夏子. アズキゾウムシ由来のボルバキアがマツノマ

ダラカミキリに引き起こす細胞質不
合．第 125 回日本森林学会大会．2014 年
3 月 29 日．大宮ソニックシティー（埼玉
県）

相川拓也・安佛尚志・今藤夏子．アズキ
ゾウムシからマツノマダラカミキリへ
のボルバキア人工感染の試み．第 123 回
日本森林学会大会．2012 年 3 月 28 日．
宇都宮大学

相川拓也・二河成男・安佛尚志．ボルバ
キアに感染したマツノマダラカミキリ
個体群の探索．第 122 回日本森林学会大
会．2011 年 3 月 27 日．静岡大学

Aikawa T. Anbutsu H. Nikoh N. Kikuchi
T. Shibata F. Fukatsu, T. Insect vecor
of pinewood nematode carried many
Wolbachia genes on an autosome. XXIII
IUFRO World Congress. 2010 年 8 月 27
日．COEX (Seoul, Korea)

相川拓也・安佛尚志・二河成男・菊地泰
生・柴田洋・深津武馬．マツノマダラカ
ミキリから検出される共生細菌ボルバ
キアの正体 第 121 回日本森林学会大会．
2010 年 4 月 4 日．筑波大学

6．研究組織

(1)研究代表者

相川 拓也 (Aikawa Takuya)

独立行政法人森林総合研究所・東北支所・

主任研究員

研究者番号：90343805