

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 6 月 10 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22780048

研究課題名（和文） 共生細菌二種共同による昆虫性比偏向とそれを阻害するオス因子の動態
 研究課題名（英文） Population dynamics of Japanese male planthoppers canceling the male-killing phenomenon by symbiotic bacteria in the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus*.

研究代表者

真田 幸代（SANADA SACHIYO）

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構・九州沖縄農業研究センター・生産環境研究領域・主任研究員

研究者番号：80533140

研究成果の概要（和文）：ヒメトビウンカには共生細菌であるウォルバキアとスピロプラズマが感染している。台湾個体群におけるスピロプラズマの感染がオス殺しによるメス性比偏向現象をもたらすことを明らかにした。一方、日本の九州地域個体群では台湾と同様にスピロプラズマによるオス殺しが起こるが、西日本や東日本個体群では一部のオスにオス殺しを無効化する個体が存在することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：*Spiroplasma* infected in the small brown planthopper causes male-killing and female-biased sex ratio of progenies produced by infected females in Taiwan populations. We performed cross experiments between females of female biased lines and males in various populations from eastern and southern parts of Japan. All of the pairs crossed with males in Kyushu populations produced only female adult progenies. However, some pairs crossed with males in western and eastern Japanese populations produced male progenies at the normal sex ratio. This result suggests that male-killing phenomenon in *Spiroplasma* is canceled by some of males in the western and eastern Japanese populations.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：細胞内共生細菌・性比偏向・ヒメトビウンカ・スピロプラズマ・ウォルバキア

1. 研究開始当初の背景

ウォルバキアやスピロプラズマに代表される細胞内共生細菌は多くの昆虫類に感染し、通常オスを通じた垂直伝搬はないが、母親から卵の細胞質を通して垂直伝搬する。このため、共生細菌の多くは、自らの遺伝子を効率よく伝搬するため寄主の生殖様式を

様々な方法で操作することが知られている。例えばウォルバキアでは、感染オスと非感染メスが交尾した場合にその卵を不妊化させたり（細胞質不和合）、感染したメスの産んだオス卵を特異的に殺し、性比をメスに偏らせたりする（オス殺し：male killing）。このような共生細菌感染が個体群性比をも偏

らせるならば、個体群動態にも大きな影響を及ぼす。このことから、近年、その性比偏向メカニズムに進化的観点のみならず、個体群管理の点からも注目が集まっている。しかし、メカニズムの詳細は未解明で、世界中の研究者が様々な分野からアプローチしている。

近年東アジア地域で多発して大きな問題となっているヒメトビウンカ（図1）は、イネ縞葉枯ウイルスやイネ黒すじ萎縮ウイルスを媒介する重要な水稻害虫である。ヒメトビウンカの一部地域（台湾・台東省、図2）から採集した系統でメスに偏った集団性比となっていること、さらに台東系統にはヒメトビウンカの共生細菌として古くから知られているウォルバキア他に、スピロプラズマが感染していることを発見した。ウォルバキアがヒメトビウンカに感染すると、感染オスと非感染メスとの交配を不妊化させる（細胞質不和合）ことが知られている。一方、スピロプラズマはキイロショウジョウバエなどでオス殺しにより仔の性比をメスに偏らせることが知られているが、不完全変態の昆虫でスピロプラズマによるオス殺しを明らかにした研究例は無い。台東系統の個体は、ウォルバキアに100%感染し、さらにスピロプラズマの感染率も正常性比の他個体群に比べ高かった。そのため性比偏向にスピロプラズマやウォルバキアが関与している可能性が高いと考えられた。そこで本研究ではウォルバキアとスピロプラズマがメス性比偏向現象に関与しているかどうかを検証した。

また、実験室内で経代飼育していた地域系統で、オス殺し現象を検証したところ、日本の本州地域の系統にはメス偏向現象を阻害する遺伝因子を持つオスを発見した。共生細菌による性比偏向現象とそれ阻害する因子の存在は、近年観察された海外飛来集団と土着集団との交雑問題や、その後の個体群動態にも大きく影響を与え得るという点で、個体群管理のうえでも非常に重要な情報となる。このオス殺しを無効化するオス個体が、日本の野外の地域個体群に存在するのか、その分布はどのような傾向なのかを明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

(1) スピロプラズマによるオス殺し

①ヒメトビウンカの台湾・台東の一部系統で、性比がメスに大きく偏っていることを発見したが、野外で採集される個体はウォルバキアに全て感染しているため、メス偏向（FB）系統はウォルバキアとスピロプラズマの二重感染になっている。ウォルバキア単独感染系統ではオス殺しは起きないことは明らかだが、オス殺しがウォルバキアとスピロプラズマの両者の共同作用によって引き

起こされている可能性が考えられた。そこで本研究では、これらの共生細菌2種が共同してヒメトビウンカの仔の性比をメスに偏らせているか、あるいはスピロプラズマ単独でオス殺しを行っているかを実験的に検証した。

②オス殺しのタイミング

共生細菌によるオス殺しには、卵の時期にオスを殺す early male killing と、孵化した後、幼虫期（若虫）の後半でオスを殺す late male killing の2つのタイプが知られている。これまで報告されている共生細菌によるオス殺しは、そのほとんどが early male killing である。これはなるべく早い時期にオスを殺すことで姉妹の適応度を上げることができるためと考えられている。一方、late male killing は、感染オスからの水平伝搬の可能性が指摘されており、進化生態学的意義に加え、用学的にも、どちらの形質を持つかは重要な問題である。そこで、オス殺しのタイミングを明らかにするため、FB系統のメスが生産した卵の孵化率、幼虫の齢ごとの死亡率を調査し、オス殺しが行われるタイミングを調査した。

(2) 日本個体群のオスによるオス殺し無効化現象

台湾個体群でみられたスピロプラズマによるオス殺しが、日本個体群でも起こっているかどうかを明らかにするため、FB系統のメスと、比較的最近に採集した日本の各地域系統（図3）のオスを交配させ、メス偏向現象を阻害する遺伝的因子の地理的分布について検証した。



図1 ヒメトビウンカのメス（左）とオス（右）（体長：約2mm）

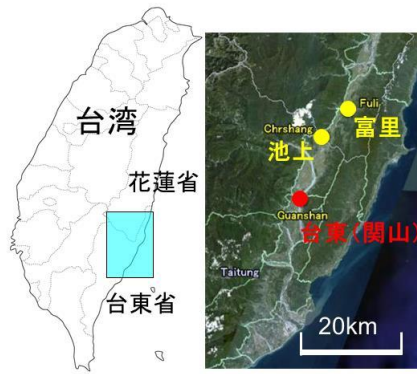


図2 台湾・台東個体群の位置
赤字がメス性比偏向がみられた個体群が採集された台東（関山）。

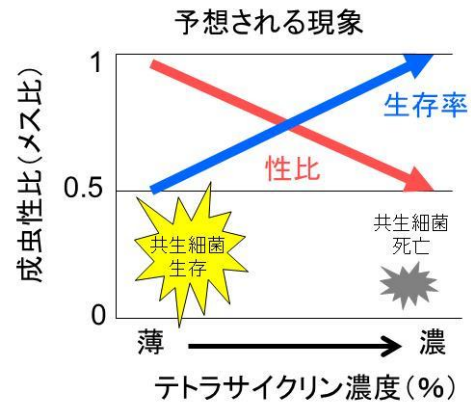


図3 テトラサイクリン処理による効果

3. 研究の方法

(1) スピロプラズマによるオス殺し

① 抗生物質による共生細菌除去実験

様々な濃度で抗生物質テトラサイクリンを処理し、野外では存在しないスピロプラズマ単独感染系統を創出した。テトラサイクリンの濃度が高いほど共生細菌が除去されるため、仔の性比も正常に近づくと予測される(図3)。また、ウォルバキアとスピロプラズマでは、除去されるテトラサイクリンの濃度に違いがみられ、スピロプラズマよりもウォルバキアの方がより低い濃度でも除去された。この除去濃度の違いを利用すれば、スピロプラズマ単独感染系統を創出することができる。さらにスピロプラズマもウォルバキアも感染していない系統、ウォルバキア単独感染系統について、それぞれ仔の性比を調査し、スピロプラズマだけでオス殺しが起こるか検証した。

② オス殺しのタイミング

メスのみを生産するメス偏向(FB)系統と、スピロプラズマに感染していない正常性比系統(NB系統)を用いて、それぞれのメスが生産した卵の孵化率・孵化した幼虫の1齢～5齢での死亡率を比較した。

(2) 日本個体群のオスによるオス殺し無効化現象

スピロプラズマによるオス殺しが日本個体群でも起こっているか検証するため、台湾系統から創出したメス性比偏向系統(FB系統)のメスに、宮城、栃木、静岡、岐阜、和歌山、愛媛、新潟、鳥取、山口、熊本、佐賀、沖縄県から採集したオスを1組ずつ交雑させ(50組/地域系統)、メス1個体ずつガラス管にイネ芽出しをいれた容器で産卵させた。その後孵化した幼虫を成虫になるまで飼育し(図4)、各組の次世代の性比を調査した。

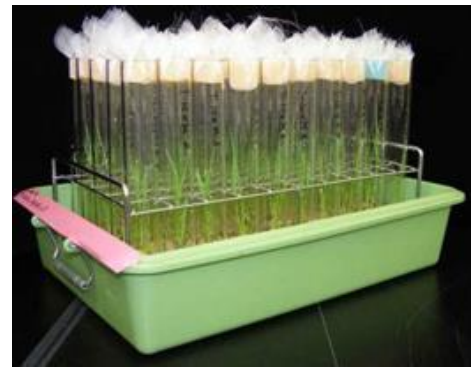


図4 交雑組ごとの個別飼育方法

4. 研究成果

(1) スピロプラズマによるオス殺し

① 抗生物質による共生細菌除去実験

野外個体群のヒメトビウнкаはほぼ100%ウォルバキアに感染しているため、スピロプラズマにのみ感染している個体はほとんどみられない。抗生物質テトラサイクリンで処理すると、スピロプラズマよりも比較的低い濃度でウォルバキアが除去されるため、スピロプラズマ単独感染系統の創出に成功した。この系統の仔の性比はほぼ全てメスとなった。この結果から、スピロプラズマ単独でオス殺しが行われることを示した。これは、スピロプラズマによるオス殺しが不完全変態昆虫で起こっていることを示した初めての研究例である。

② オス殺しのタイミング

FB系統の卵の死亡率はNB系統よりも有意に高かったが、約80%は孵化しており、オスの仔をすべて殺すには至らなかった。幼虫期の死亡率については、4～5齢でFB系統の死亡率が1～3齢期よりも有意に高く、オ

ス殺しは老齢幼虫で行われていることが示唆された。さらに、スピロプラズマの感染量（相対量）を定量PCRにより計測した結果、幼虫期の感染量は4～5齢期に上昇することが明らかになった。これらの結果から、スピロプラズマによるオス殺しは4、5齢期に行われていると考えられ、今後、スピロプラズマの単離や人為的導入の技術を確立する上で非常に有用な知見を得ることができた。

(2) 日本個体群のオスによるオス殺し無効化現象

東日本と太平洋側（宮城、栃木、静岡、和歌山）（図3、青色の県）では、多くの組み合わせでオスが生産され、スピロプラズマによるオス殺しが無効化されていた。オスを生産した組み合わせの割合を算出したところ、東日本と太平洋側の個体群では、8割程度を占めていた。一方、日本海側や西日本（新潟、岐阜、鳥取、山口、愛媛、熊本、佐賀、沖縄県）（図5、赤色の県）のオスとの交雑ではオスを生産した組み合わせの割合は、2割程度となり、ごく少数であった。台湾個体群や中国江蘇省の個体群のオスとFB系統のメスとの交雑では、全ての組み合わせで次世代はほぼ全てメスとなった。これらの結果から、日本個体群にはスピロプラズマによるオス殺しを無効化するオスが存在し、太平洋側や東日本に多く分布し、反対に日本海側や西日本では、中国や台湾と類似した傾向にあることが示された。

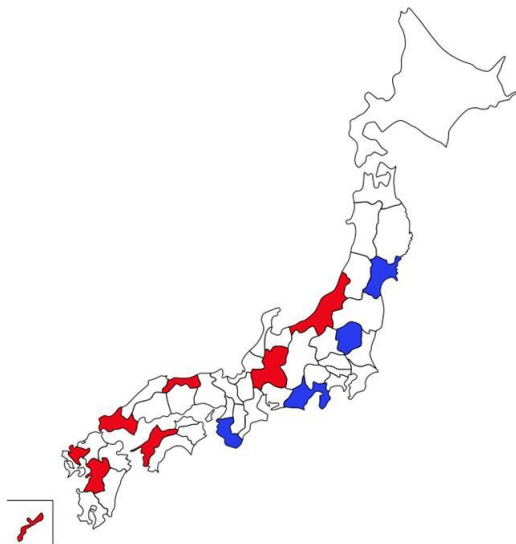


図5 交配実験に用いた個体群の採集地
東日本と太平洋側の県（青塗り）と
日本海側と西日本の県（赤塗り）。

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）

〔学会発表〕（計5件）

① 真田幸代、松村正哉、野田博明、ヒメトビウンカの共生細菌によるオス殺しを無効化するオスの地理的分布と中国・台湾個体群との関係、第57回日本応用動物昆虫学会大会、2013年3月28日、神奈川県藤沢市。

② S. Sanada-Morimura, M. Matsumura, H. Noda, Sex ratio distortion by a male-killing Spiroplasma in the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus*. XXIV International Congress of Entomology, 2012年8月23日、大邱・韓国。

③ 真田幸代、松村正哉、野田博明、ヒメトビウンカ台湾個体群のスピロプラズマ感染によるメス偏向性比、第56回日本応用動物昆虫学会大会、2012年3月28日、奈良県奈良市。

④ 真田幸代、松村正哉、野田博明、ヒメトビウンカ終齢幼虫で起こる共生細菌スピロプラズマのオス殺し、第55回日本応用動物昆虫学会大会、2011年3月26日、千葉県千葉市。

⑤ S. Sanada-Morimura, M. Matsumura, H. Noda, Sex ratio distortion by a *Spiroplasma* symbiont in the small brown planthopper, *Laodelphax striatellus*. 13th Auchenorrhyncha Congress, 2010年7月1日、ヴェゾン・ラ・ロメーヌ・フランス。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真田 幸代 (SANADA SACHIYO)

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構・九州沖縄農業研究センター・生産環境研究領域・主任研究員

研究者番号：80533140

(2) 研究協力者

野田 博明 (NODA HIROAKI)

独立行政法人 農業生物資源研究所・昆虫科学研究領域・特任上級研究員

研究者番号：40343991