

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580076

研究課題名(和文) チャハマキで発見された新たなオス殺し現象の原因因子の解明

研究課題名(英文) Causative agents of early male-killing phenomenon newly found in *Homona magnanima*

研究代表者

国見 裕久 (Kunimi, Yasuhisa)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：50195476

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、チャハマキ静岡系統の胚期雄殺しの原因因子を明らかにすることを目的としている。静岡系統は、Spiroplasma (Sp) と Wolbachia に混合感染していることが明らかとなった。両細菌に感染していない系統に静岡系統の幼虫の体液を注射接種したところ、Sp 単独感染系統が作出され、本系統ではオスが出現しなかった。このことから、胚期雄殺しの原因因子は、Sp であることが明らかとなった。チャハマキ幼虫個体群において、オス殺し因子の有病率の季節的変動を調査した結果、有病率の季節的変動は Sp が 0.9%～15.1%、幼虫期雄殺しの原因因子である RNA ウイルスが 4.3%～12.9% の間を推移した。

研究成果の概要(英文)：The early male-killing strain of *H. magnanima* (Shizuoka strain) was collected in a tea field in Shizuoka, 2009. Purpose of this study was to identify the early male-killing agent. By running PCR with Wolbachia and Spiroplasma primers, the Shizuoka strain was infected with both bacteria. The strain which infected only Spiroplasma was produced by injecting larval hemolymph obtained from the Shizuoka strain to the Bacteria free strain which was established by continuously administering an antibiotic to the Shizuoka strain. No male was obtained from the Spiroplasma-infected strain, suggesting that the causative agent of early male-killing is Spiroplasma. The generation changes in the prevalence of RNA virus (the late male-killing agent) and Spiroplasma in a natural population of *H. magnanima* were changed from 4.3 to 12.9% and 0.9 to 15.1%, respectively. Occurrence of *H. magnanima* infected with both RNA virus and Spiroplasma was less than 2.3%.

研究分野：昆虫病理生態学

キーワード：オス殺し Spiroplasma チャハマキ early male-killing

1. 研究開始当初の背景

オス殺しは、オスが死亡する時期により、卵および胚の時期に致死する early male-killing と、幼虫期以降に致死する late male-killing の 2 つに大別される (Hurst, 1991)。early male-killing はショウジョウバエ、テントウムシ、チョウ、キョウソヤドリコバチ等で発見されており、その原因微生物として *Wolbachia*, *Spiroplasma*, *Rickettsia*, *Flavobacteria* および *Gamma Proteobacteria* (*Arsenophonus nasoniae*) の細菌類が報告されている (Hurst & Jiggins, 2000; Watts et al., 2009)。一方、late male-killing は報告例も少なく、*Culex* 属、*Aedes* 属、*Anopheles* 属の力 (Kellen et al., 1965; Hurst, 1991) およびチャハマキ (Morimoto et al., 2001) で報告されている。チャハマキにおける late male-killing では、RNA ウイルス (雄殺しウイルス) の感染によりオスの幼虫および蛹が選択的に致死することを既に報告した (Nakanishi et al., 2008)。また、最近、ショウジョウバエにおいて、*Spiroplasma* が引き起こすオス殺しは、メスの日齢により、early male-killing と late male-killing が出現することが明らかにされた (Kageyama et al., 2007)。

2009 年に静岡県 の茶園で採集したチャハマキ (静岡系統) において、本ウイルスに感染していないにもかかわらず、性比がメスに偏る系統を発見した。この系統の卵のふ化率が 50% 以下であることから、オスの胚子が選択的に致死する early male-killing であると考えられる。また、雄殺しウイルスに感染したチャハマキ幼虫は、静岡系統が採集された茶畑にも分布している。異なる原因因子によって引き起こされる early male-killing と late male-killing が同一個体群で発見された例はなく、極めてユニークな現象である。

2. 研究の目的

茶樹の重要害虫であるチャハマキの野外個体群において、オスの幼虫および蛹の選択的致死 (late male-killing) により、成虫の性比がメスに偏る系統 (late male-killing 系統; 以下 late 系統) が存在し (Morimoto et al., 2001) その原因因子が RNA ウイルス (雄殺しウイルス) であることを申請者らの研究により明らかにした (Nakanishi et al., 2008)。一方、2009 年に静岡県で採集したチャハマキ (静岡系統) において、本ウイルスに感染していないにもかかわらず、性比がメスに偏る系統を発見した。この系統の卵のふ化率が 50% 以下であることから、オスの胚子が選択的に致死する early male-killing であると考えられる。

本研究では、静岡系統 (early male-killing 系統) の原因因子を明らかにするとともに、野外個体群での本因子の有病率 (prevalence) の変動、本オス殺し系統の地理的分布、さらに既知オス殺しウイルスとの

相互作用について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 共生細菌の同定

これまで early male-killing の原因細菌として報告されている *Wolbachia*, *Spiroplasma*, *Rickettsia*, *Flavobacteria* および *Arsenophonus nasoniae* の静岡系統への感染の有無を PCR 診断により調査した。供試したプライマーは、*Wolbachia* (99F: TTGTAGCCTGCTAGGTATAACT, 994R: GAATAGGTATG ATTTTCATGT, *Spiroplasma* (Ha-1N-1: GCTCAACC CTAACCGCC, SP=ITS-N2: GGTAGTAGTCACGTCTT CATCG), *Rickettsia* (RpCS.877p: GGGGGCCTGCT CACGGCGG, RpCS.1258n: ATTGCAAAGTACAGTGAA CA), *Flavobacteria* (CLOf: GCGGTGTAATAAGAGC GTG, CLOr1: ACCTMTTCTTAAGCAGCCT) および *Arsenophonus nasoniae* (CAIF: GCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATG, CAIR: GTCATC CCCACCTCC) であった。

(2) 抗生物質処理による共生細菌単独感染系統およびフリー系統の作出

静岡系統は、*Wolbachia* および *Spiroplasma* に混合感染していることが明らかとなったため、抗生物質 (テトラサイクリン) 処理により、共生細菌単独感染系統およびフリー系統を作出した。さらに、静岡系統幼虫から採取した血リンパをフリー系統の 4 齢幼虫に注射接種して、*Spiroplasma* 単独感染系統を作出した。

(3) 野外個体群での有病率の調査

静岡県島田市金谷の茶畑において、各世代 (第 1 ~ 第 4 世代) の幼虫を採集し、人工飼料 (インセクタ、日本農産工業) により個別飼育し、メス成虫を得た。得られたメス成虫の腹部を正中線で 2 分割し、それぞれから RNA と DNA を抽出した。得られた RNA を鋳型として、雄殺しウイルスに特異的な配列 (C3 配列) を検出するプライマー (C3 primer: C3-F (Forward primer) 5' -AAGATGCAAGCC-3' ; C3-R (reverse primer) 5' -CCCTACCGCCTCACATC-3') を用いて、RT-PCR 反応を行った。C3 配列が検出された個体をオス殺しウイルスに感染している個体とした。得られた DNA を鋳型として、*Wolbachia* および *Spiroplasma* 感染の有無を PCR 診断により調査した。

(4) オス殺しウイルスと *Spiroplasma* 混合感染系統の作出

Late 系統の雌成虫腹部磨砕液を 1 重、2 重、および 4 重のガーゼを用いて濾過した。得られた濾液を 1.5ml マイクロチューブに分注し、4、1,500 × g、20 分間遠心分離した。その後、上清を新しい 1.5ml マイクロチューブに移し、4、10,000 × g、60 分間遠心分離した。得られた上清は 0.45 μm、0.22 μm 径のフィルター (MILLIPORE) で順次濾過した。この濾

液を静岡系統に抗生物質処理によって作出した *Spiroplasma* 単独感染系統の4齢幼虫に注射接種した。幼虫は蛹になるまで人工飼料インセクタLF片の入った15ml オンスカップで個別飼育した。その後毎日観察し、生死と成長段階を記録し、羽化した雌個体は3-3.と同様の方法で産卵させた。交配に供試した雄成虫は free 系統を用いた。産卵した雌成虫は前述の方法で *Spiroplasma* および RNA ウイルスの感染状況を確認した。

4. 研究成果

(1) 共生細菌の同定

静岡系統は、*Spiroplasma* と *Wolbachia* に混合感染していた。Late male-killing 系統は、RNA ウイルスと *Wolbachia* に混合感染していた(図1)。

(2) 抗生物質処理による共生細菌単独感染系統およびフリー系統の作出

静岡系統を0.1%のテトラサイクリン塩酸塩を含む人工飼料シルクメイト2S(日本農産工業(株))を2世代間与えて飼育した結果、細菌に感染していないフリー系統が作出できた。また、late male-killing 系統に同様な処理を行った結果、RNA ウイルス単独系統が作出された。一方、抗生物質処理により、*Spiroplasma* あるいは *Wolbachia* 単独感染系統の作出を試みたところ、*Wolbachia* 単独感染系統は作出できたが、*Spiroplasma* 単独感染系統は作出できなかった。*Wolbachia* 単独感染系統の性比はほぼ0.5であったことから、*Wolbachia* は early male-killing の原因因子でないことが明らかとなった。

そこで、静岡系統幼虫から採取した血リンパをフリー系統の4齢幼虫に注射接種したところ、*Spiroplasma* 単独感染系統が作出された(図1)。

フリー系統の性比が約0.5であったこと、*Spiroplasma* 単独感染系統のふか率がフリー系統と比べて著しく低かったことおよび *Spiroplasma* 単独感染系統では、オスの出現が見られなかったことから、静岡系統の early male-killing を引き起こす因子は *Spiroplasma* であることが明らかとなった(図2)。

(3) 野外個体群での有病率の調査

2012年第1世代から2014年第3世代まで、毎世代チャハマキ幼虫のRNA ウイルスおよび *Spiroplasma* の有病率を調査した結果、RNA ウイルスの有病率は4.2%~12.9%の範囲で変動し、*Spiroplasma* の有病率は0.9%~15.1%の範囲で変動した(図3)。また、RNA ウイルスと *Spiroplasma* に混合感染していた個体は、2012年越冬世代、2013年第1~第3世代、2014年の第3世代で確認されたが、その有病率は、2.7%以下と著しく低かった。

(4) オス殺しウイルスと *Spiroplasma* 混

合感染系統の作出

Late 系統のメス成虫腹部磨砕液を *Spiroplasma* 単独感染系統の4齢幼虫に注射接種後、2世代にわたり累代飼育した結果、RNA ウイルスと *Spiroplasma* に混合感染している系統(混合感染系統)の作出に成功した。

本系統の生態的特性について調査した結果、ふ化率はFree系統およびLate系統と比較して有意に低く、発育速度は、Free系統、*Spiroplasma* 単独感染系統と比べて、有意に早いことが明らかとなった。

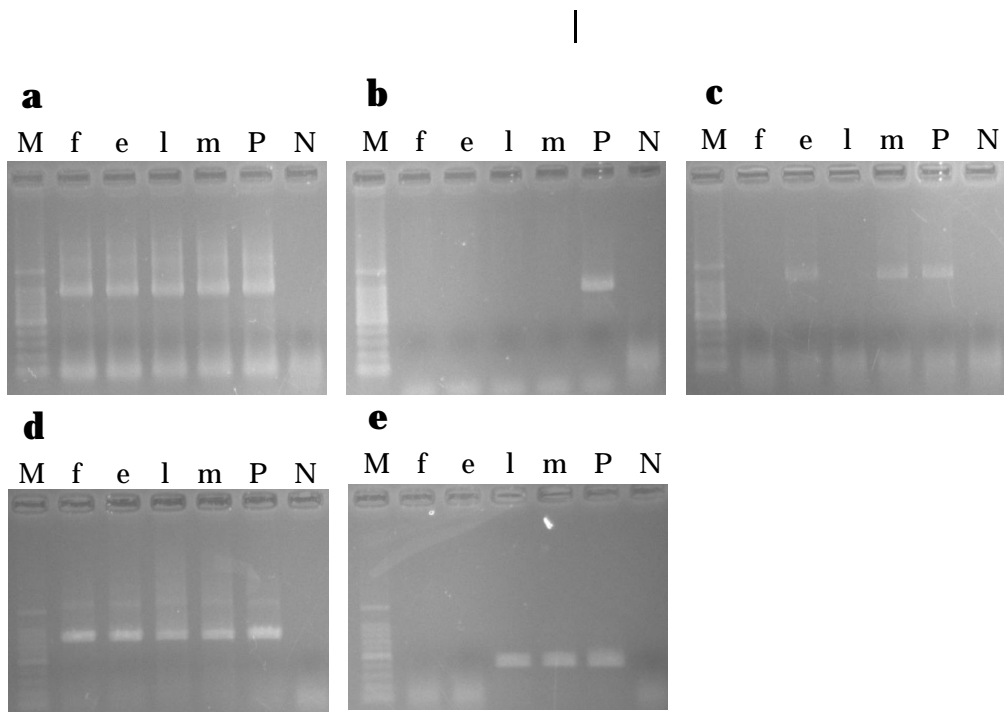


図1. *Wolbachia*, *Spiroplasma* および RNA ウイルスの検出。
 aは β -actin, bは *Wolbachia*, cは *Spiroplasma* をそれぞれの系統から抽出した DNA から検出した。
 dは β -actin, eは RNA ウイルスをそれぞれの系統から抽出した RNA から検出した。
 M: 100bp DNA Ladder 分子量マーカー, f: free 系統雌個体, e: *Spiroplasma* 系統雌個体, l: late 系統雌個体, m: 混合感染系統雌個体, P: ポジティブコントロール, N: ネガティブコントロール。

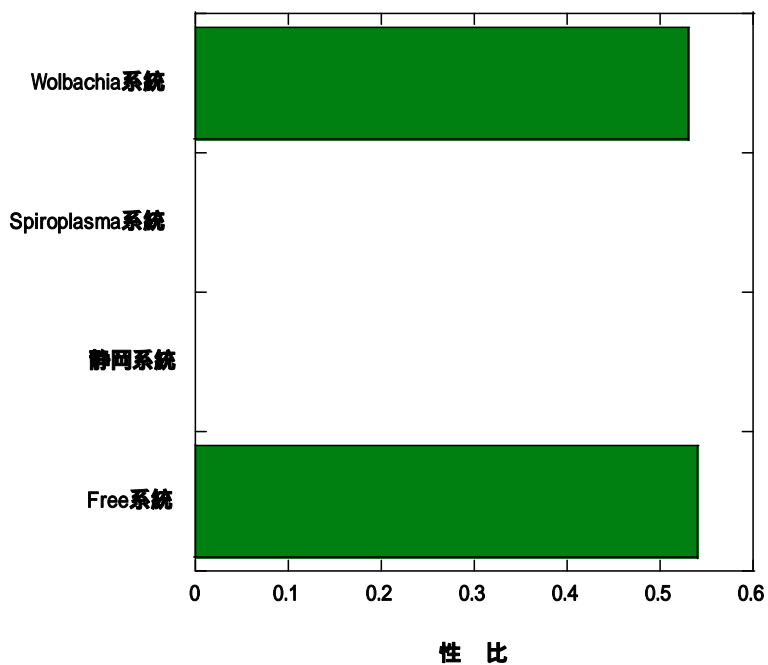


図2 *Wolbachia* 単独感染系統, *Spiroplasma* 単独感染系統, 静岡系統および Free 系統の性比 (オスの割合)。

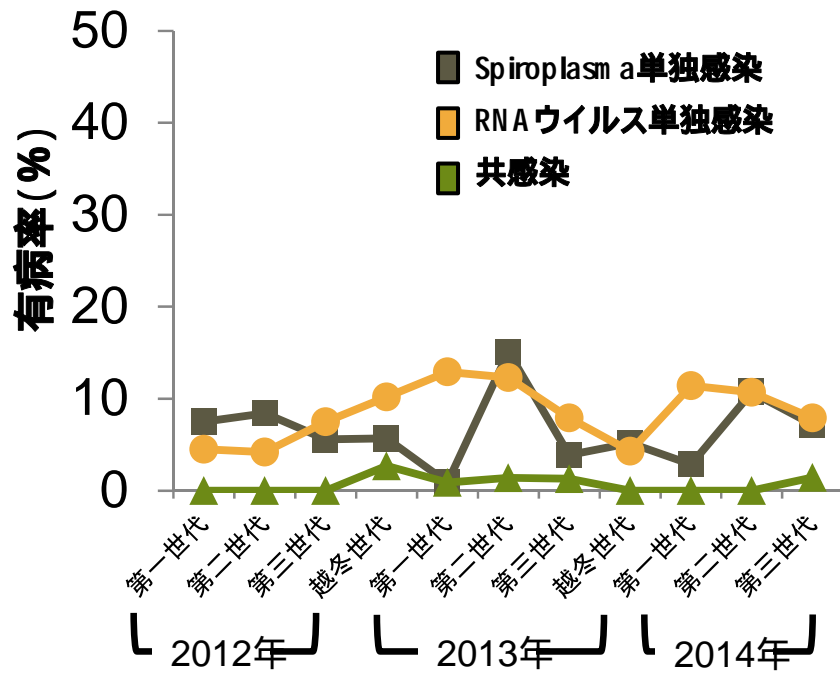


図3 チャハマキ個体群における *Spiroplasma* および RNA ウイルスの有病率の世代間変動。

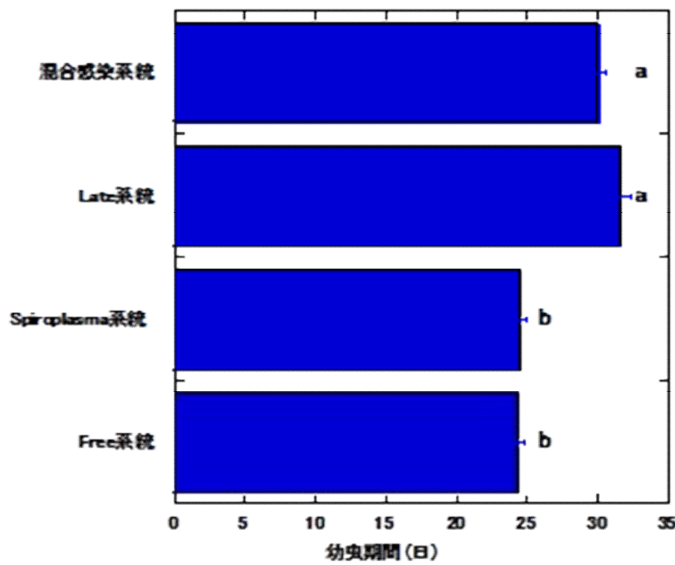


図4 Free 系統, *Spiroplasma* 単独感染系統, Late 系統および混合感染系統の幼虫期間。異なるアルファベットは有意差があることを示す ($P < 0.05$)。

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 0件)

〔学会発表〕(計 6件)

国見裕久(2014) 害虫防除における天敵微生物の利用:歴史と展望(招待講演) 東京農業大学総合研究所研究会農薬部会第94回セミナー、2014年7月11日、東京農業大学(東京都・世田谷区)

阿部信彦・井上真紀・仲井まどか・国見裕久(2014) チャハマキ個体群における2種類のmale-killing因子の有病率とmale-killing系統の生態的特性、第58回日本応用動物昆虫学会大会、2014年3月26日~28日、高知大学(高知県・高知市)

国見裕久(2013) チャハマキにおけるオス殺し(招待講演) 第57回日本応用動物昆虫学会大会、2013年3月27日~29日、日本大学生物資源科学部(神奈川県・藤沢市)

阿部あかね・柘野優輔・仲井まどか・国見裕久(2012) チャハマキにおけるオス殺しの適応的意義:宿主の発育と昆虫ポックスウイルスに対する感受性に及ぼす影響、第10回昆虫病理研究会シンポジウム、2012年9月21日~23日、帯広畜産大学(北海道・帯広市)

阿部信彦・仲井まどか・国見裕久(2012) チャノコカクモンハマキに共生している*Wolbachia*の宿主への影響、第10回昆虫病理研究会シンポジウム、2012年9月21日~23日、帯広畜産大学(北海道・帯広市)

平野達也・阿部あかね・井上真紀・仲井まどか・国見裕久(2014) チャハマキにおける*Wolbachia*感染が発育および昆虫ポックスウイルスに対する感受性に及ぼす影響、第11回昆虫病理研究会シンポジウム、2012年9月18日~20日、人材開発センター富士研修所(山梨県・富士吉田市)

〔図書〕(計 1件)

— 国見裕久・小林迪弘(2014) 最新昆虫病理学、講談社、271p

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tuat.ac.jp/~insect/>

6. 研究組織

(1)研究代表者:

国見 裕久(KUNIMI, Yasuhisa)
東京農工大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号: 50195476

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

仲井 まどか(NAKAI, Madoka)
東京農工大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号: 60302907