

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850031

研究課題名(和文) 侵入害虫キムネクロナガハムシの分布拡大及び大発生のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanisms of outbreak and range expansion of the coconut beetle

研究代表者

高野 俊一郎 (Takano, Shun-ichiro)

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：90725045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、世界的規模の物流の増加に伴い侵入害虫が農作物や環境に与える問題も深刻化しているが、新天地における侵入昆虫の害虫化のメカニズムは未知の点が多い。本研究では、ココヤシの侵入害虫キムネクロナガハムシに存在する遺伝的に異なる2系統のうち一方のみが分布を拡大し大発生していること、その要因として大発生系統は高木、低木ともに加害するが、大発生しない系統は低木のみを加害することを明らかにするとともに、寄主植物の分布がハムシの分布拡大に影響することを示した。また、両系統は交尾はするが、産まれた卵のふ化率は著しく低い。この現象を引き起こすのが、ハムシの生殖器官に共生する新規細菌であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The coconut beetle is a serious pest of coconut palm which contains two clades, the Asian and the Pacific. We investigated the damage potential on coconut palm and range expansion of the two clades in East Timor, where both clades are present. Our results indicated that range expansion and outbreaks have occurred for the Asian clade alone. The Asian clade attacked trees taller than 10 m, whereas the Pacific clade seldom attacked these trees. The preference for the taller trees, which are more abundant, can facilitate range expansion and outbreaks of the Asian clade. Beetles of the different clades mate each other but produced eggs seldom hatch. We found that a novel clade of alphaproteobacterial endosymbionts induces this phenomenon.

研究分野：昆虫生態学

キーワード：侵入種 invasive species 系統 clade 生物的防除 biological control 共生者 symbiont

### 1. 研究開始当初の背景

近年、国際規模の物流の増加により、外来昆虫が新たな場所に侵入し、在来昆虫の駆逐、作物への加害、環境の悪化など大きな問題となっている。しかし、侵入害虫が新天地で大発生し害虫化するメカニズムは未解明な部分が多い。

キムネクロナガハムシ (*Brontispa longissima*) は、パプアニューギニアやインドネシアが原産地と考えられているが、2000年以降東南アジア各国に侵入、大発生し、各地でココヤシに大きな被害を与えている。我々は、このハムシに外部形態での識別は困難だが、ミトコンドリア DNA の COI 部分配列が大きく異なる 2 系統が存在することを発見した (Takano et al. 2011)。このハムシ 2 系統の地理的分布を調べた結果、一方はパプアニューギニア、オーストラリア、インドネシアの一部に分布し (パシフィック系統)、他方はアジアをはじめその他の地域に広く分布する (アジア系統) こと、2000 年以降分布を拡大し各地で大発生しているのはアジア系統のみであること、また優占系統がパシフィック系統からアジア系統に置換したと考えられる地域が存在することが明らかとなった (Takano et al. 2011, 2013)。しかし、アジア系統の分散速度や分散能力は不明であり、また、パシフィック系統が存在する地域にアジア系統が侵入した場合、両系統間でどのような相互作用があるのかはわかっていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、ココヤシの侵入害虫キムネクロナガハムシが新天地に分布を拡大・大発生し、害虫化するメカニズムを明らかにするため、両系統が存在するチモール島における現地調査により 2 系統の分布、ココヤシへの加害状況、競争などの生態的相互作用の実態を調べる。また、室内実験により、系統間の生殖隔離機構を明らかにする。それらの結果をもとに、アジア系統の害虫化の機構を考察するとともに、本系統防除技術の開発を検討する。

### 3. 研究の方法

(1) チモール島における現在のハムシ両系統の分布を明らかにするため、2014 年 7 月と 2015 年 7 月に 14 地点から 60 個体のハムシ成虫をサンプリングし、ミトコンドリア DNA の配列を元に系統を識別した。

ココヤシへの被害状況を明らかにするために、展開葉におけるハムシ加害痕の有無を調べた。2014 年には 32 地点から 1359 本、2015 年には 24 地点 689 本のココヤシを調査した。

ココヤシへの加害と樹高の関係を明らかにするために、28 地点 1254 本のココヤシの加害痕と樹高を調べた。

アジア系統の分布の拡大とココヤシの分布の関係を明らかにするために、ディリから東、西、南に延びる主要な道路に沿って、ココヤシの有無、また被害の有無を 50m 毎に 100km

に渡って調査した。

(2) アジア系統とパシフィック系統間では交尾はするが産まれた卵のふ化率は低いという細胞質不和合 (CI) が起こることが知られているが (Takano et al. 2011)、この CI を引き起こす要因は不明であった。そこで系統間の CI に共生細菌が及ぼす影響を明らかにするため、抗生物質を含む人工飼料で飼育したハムシを用いて、系統間の交雑試験を行った。ハムシはチモール島で採集した個体群、すなわちディリ採集のアジア系統 (Di)、ロスパロス採集のパシフィック系統 (Lp) を用いた。

抗生物質処理により異なる系統のペアからも同じ系統のペアと同程度のふ化率が得られたことから、抗生物質によって除去される細菌の関与が示された。そこで、両系統の生殖器官に感染する細菌の有無及びその系統関係を調べた。精巣、卵巣から抽出した DNA を細菌用のユニバーサルプライマーを用いて 16s rRNA 遺伝子配列を増幅し、クローニングした後シーケンスした。

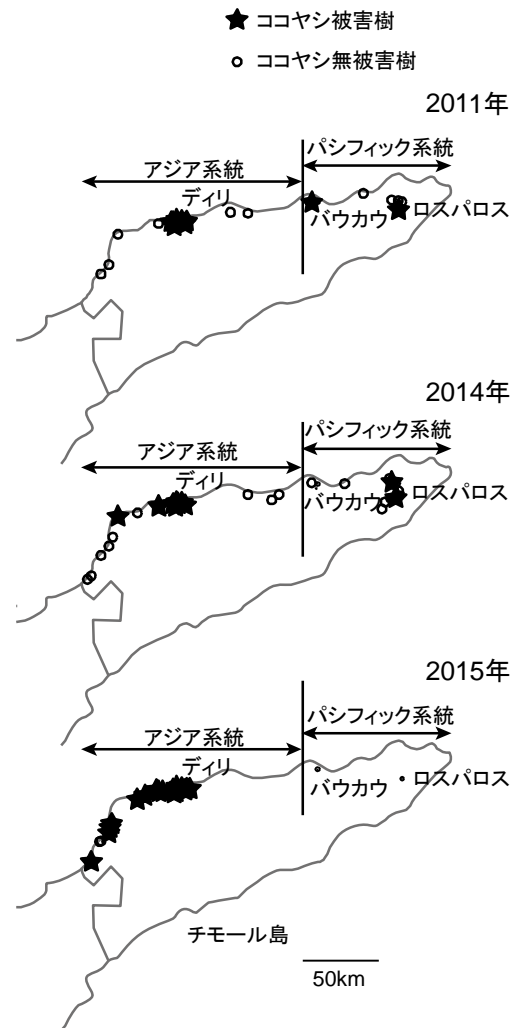


図 1 キムネクロナガハムシによるココヤシ被害樹の分布 (Takano et al. 2017b より改変)

クローニングで検出されなかった細菌の

存在を確かめるため、精巣及び卵巣内の細菌叢を Illumina MiSeq を用いて解析すると共に、DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) による解析を行った。

#### 4. 研究成果

1) 一方の系統 (アジア系統) がチモール島の中央部から西側に分布を拡大し大発生しているが、もう一方の系統 (パシフィック系統) は島の東側に分布し分布の拡大や大発生は見られなかった。両系統の分布域は重ならなかった (図 1)。

また、寄主であるココヤシの分布調査から、ハムシはココヤシが連続的に生えている場所では分布を拡大できるが、ほとんどココヤシの無い地域を越えて分布を広げることができないことが明らかとなった。

アジア系統は低木、高木共に加害するのに対し、パシフィック系統は低木のみを加害し、この高木を加害する能力がアジア系統の大発生の要因の一つと考えられた (図 2) (Takano et al. 2017b)。

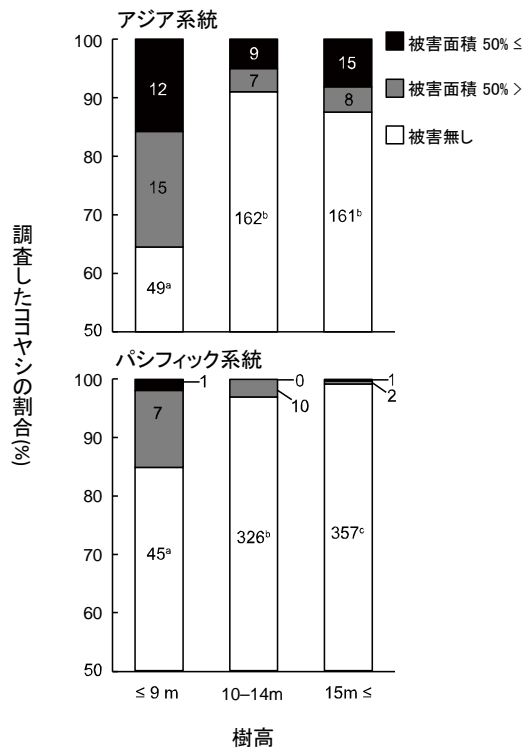
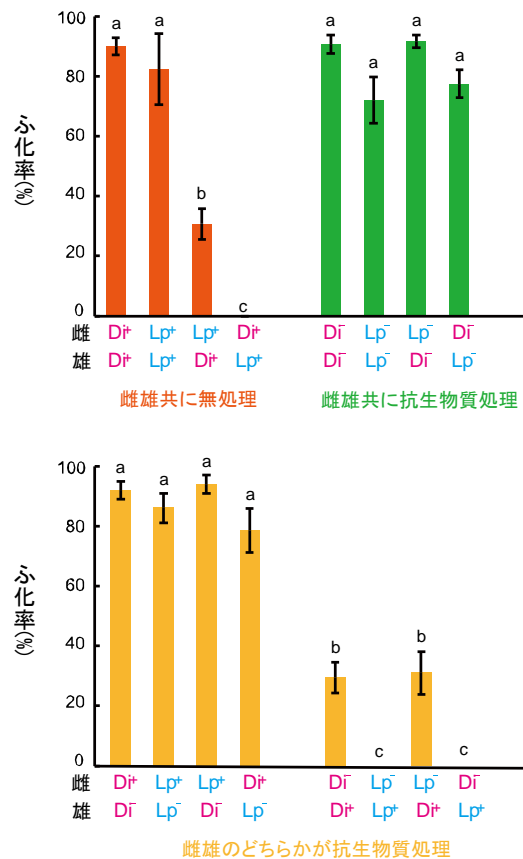


図 2 ココヤシ樹高とキムネクロナガハムシによる被害の関係 (Takano et al. 2017b より改変)

(2) 室内での交雑試験の結果、無処理区では、系統内では高いふ化率が得られたが系統間ではふ化率は低く、アジア系統(Di)雌とパシフィック系統(Lp)雄ではふ化率はゼロ、Di雄とLp雌では30%であった。しかし、いずれの組み合わせでも雄に抗生物質処理を行うと、同系統間と同様の高いふ化率が得られた (図 3)。



#### 交雑の組み合わせ

図 3 キムネクロナガハムシ 2 系統の交雑試験。(Takano et al. 2017a より改変)

16s rRNA 遺伝子配列を増幅する細菌用のユニバーサルプライマーを用いて精巣及び卵巣内の共生細菌を検出したところ Lp から  $\alpha$  プロテオバクテリア綱に属する新規細菌 (以下細菌 L) が、Di からはボルバキアが検出された (図 4)。

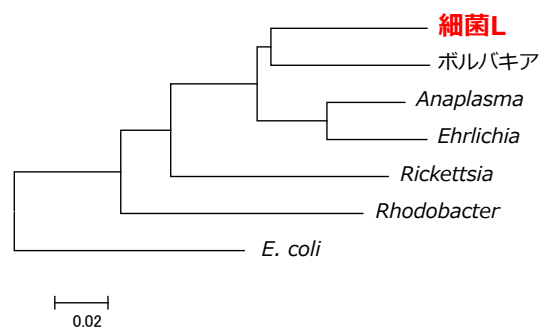


図 4 近隣接法による、キムネクロナガハムシ 2 系統の精巣及び卵巣から検出された共生細菌の系統樹 (Takano et al. 2017a より改変)

これら細菌に特異的なプライマーを用いて抗生物質処理した個体内の共生細菌の感染の有無を確認したところ、抗生物質処理によりこれらの細菌は除去されたことが明らかになった。また、細菌叢解析の結果、ハムシ生殖器官内の優占細菌種は Lp では細菌 L のみ、Di ではボルバキアのみであることが分か

った。これらから、Lp 雄と Di 雌間の完全な CI (100%の致死率)は細菌 L によって、Di 雄と Lp 雌間の不完全な CI (70%の致死率)はボルバキアによって引き起こされると考えられた (Takano et al. 2017a)。

細菌 L はボルバキア、カルディニウムに次いで 3 例目の CI を引き起こす細菌と考えられる。人工的に細菌 L に感染させた個体を室内で大量増殖し野外に放飼することによって、野生の非感染雌が野生の雄と交尾する機会が減り害虫個体数が激減する等の新たな防除法の開発につながる可能性がある。

#### <引用文献>

- ① Takano et al. Two cryptic species within *Brontispa longissima* (Coleoptera: Chrysomelidae): evidence from mitochondrial DNA analysis and crosses between the two nominal species. *Ann Entomol Soc Am* 104:121-131, 2011.
- ② Takano et al. Rapid discrimination of two cryptic species within *Brontispa longissima* (Gestro) (Coleoptera: Chrysomelidae) by PCR-RFLP. *J Pest Sci* 86:151-155, 2013.
- ③ Takano et al. Unique clade of alphaproteobacterial endosymbionts induces complete cytoplasmic incompatibility in the coconut beetle. *PNAS Accepted* 2017a. DOI: 10.1073/pnas.1618094114
- ④ Takano et al. Differences in invasiveness between two cryptic species of the coconut beetle *Brontispa longissima* in Timor-Leste. *Biol Invasions* 19:1839-1851, 2017b.

#### 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 Takano S, Tuda M, Takasu K, Furuya N, Imamura Y, Kim S, Tashiro K, Iiyama K, Tavares M, Amaral AC, Unique clade of alphaproteobacterial endosymbionts induces complete cytoplasmic incompatibility in the coconut beetle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 査読有 Accepted. 2017a. DOI: 10.1073/pnas.1618094114
- ② Takano S, Takasu K, Tavares M, Gusmao M, Amaral AC, Differences in invasiveness between two cryptic species of the coconut beetle *Brontispa longissima* in Timor-Leste. *Biological Invasions*, 査読有 19:1839-1851, 2017b. DOI: 10.1007/s10530-017-1394-4
- ③ 高野俊一郎・高須啓志、キムネクロナガハムシに存在する 2 つの系統、昆虫と自然、査読無、50 巻、2015、pp12-16.

##### [学会発表] (計 4 件)

- ① 高野俊一郎、キムネクロナガハムシ系統間の細胞質不和合を引き起こすボルバキ

ア様細菌、第 76 回昆虫学会・第 60 回日本応用動物昆虫学会、2016.03.29、大阪府立大学 (大阪府堺市)

- ② 高野俊一郎、高須啓志、一木良子、中村達、キムネクロナガハムシ食害ココヤシ葉に対する幼虫寄生蜂と蛹寄生蜂の異なる反応、第 59 回日本応用動物昆虫学会、2015.03.27、山形大学 (山形県山形市)
- ③ Takano S, The existence of two cryptic species within the coconut beetle, XL Kyushu Entomology Seminar (40<sup>th</sup> KEyS), 2015.02.08、九州大学 (福岡県福岡市)
- ④ 高野俊一郎、侵入害虫キムネクロナガハムシの分布拡大と大発生、日本昆虫学会九州支部会第 62 回大会、2014.12.06、宮崎大学 (宮崎県宮崎市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/128>

<http://www.kyushu-u.ac.jp/en/researches/view/57>

<http://www.kyushu-u.ac.jp/ja/university/publicity/pressrelease/latest/>

<http://www.kyushu-u.ac.jp/en/university/publicity/pressrelease/>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

高野 俊一郎 (Takano, Shun-ichiro)  
九州大学・農学研究院・助教  
研究者番号：90725045

(2)研究分担者 ( )

研究者番号 :

(3)連携研究者 ( )

研究者番号 :

(4)研究協力者

高須 啓志(Takasu, Keiji)  
津田 みどり(Tuda, Midori)  
古屋 成人(Furuya, Naruto)  
今村 友哉 (Imamura, Yuya)  
Kim Sangwan  
田代 康介(Tashiro, Kosuke)  
飯山 和弘(Iiyama, Kazuhiro)  
中村 達 (Nakamura, Satoshi)  
一木 良子(Ichiki, Ryoko)  
Matias Tavares  
Marcal Gusmao  
Acacio Amaral