

## 論文の内容の要旨

氏名：志賀野 倫明

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：小笠原産ハスモンヨトウにおける昆虫感染性微胞子虫の感染動態および分離株の系統学的類縁関係の解明

### 1. 緒言

微胞子虫は、偏性細胞内寄生性の単細胞真核生物である。宿主に感染した場合には微胞子虫病を引き起こす。原生生物から哺乳類に至るまで様々な動物に感染し、これまでに 1,500 種以上が存在することが知られている。微胞子虫 *Antonospora locustae* はアメリカでバッタ目害虫に対する微生物防除資材として使用されている。微胞子虫の中には水平感染に加えて垂直感染する株も存在するため、数世代にわたる長期的な防除効果が期待できる。しかし、現在のところ微生物農薬として利用されているのは本資材のみで、野外にはまだ知られていない防除資材として潜在的な有用株が存在している可能性がある。

そこで本研究は、微生物防除資材となりうる微胞子虫株を検索することを目的とし、東京都小笠原諸島父島にてハスモンヨトウにおける微胞子虫の感染率調査を行った。ハスモンヨトウは耐寒性がないことから、通常本州では越冬することは困難であるが、小笠原では温暖な気候であるため一年中発生していると言われている。本研究は、まず当地域におけるハスモンヨトウの発生活長と微胞子虫の感染動態の関連性の有無について検討した。さらに分離した微胞子虫株の系統関係と病原性を明らかにするため、SSU rRNA 遺伝子配列解析および 3 種のチョウ目昆虫に対する感染実験を行った。

### 2. ハスモンヨトウの発生活長および感染率調査

ハスモンヨトウは、野菜・花卉・果樹など広範囲の作物を食害する広食性の農業害虫である。成長して大きくなった老熟幼虫には化学農薬が効きにくいいため難防除害虫に指定されている。ハスモンヨトウを捕獲するため、小笠原諸島父島においてハスモンヨトウに対する性フェロモントラップを用いた捕獲実験を行った。トラップの設置期間は発生活長を調査するため 2012 年 4 月から 2015 年 3 月までの 3 年間継続して行った。捕獲したハスモンヨトウは 1 頭ずつ乳鉢ですりつぶし、位相差顕微鏡で微胞子虫胞子の有無を確認して胞子が確認できた場合、感染と判定した。

捕獲実験の結果、捕獲数と感染個体数は 2012 年度が 1,872 頭中 74 頭(3.95%)に感染、2013 年度が 2,672 頭中 87 頭(3.26%)に感染、2014 年度が 2,807 頭中 86 頭(3.06%)に感染し、3 年間では 7,351 頭中 247 頭(3.36%)が感染していた。ハスモンヨトウは毎月捕獲できたため、1 年中発生していることが示された。発生活長を月ごとに比較すると、毎月多くのハスモンヨトウが捕獲できたが、夏季(8 月頃)に減少した。この期間は気温の高い時期と一致しており、天敵の出現または高温による生理障害などが考えられる。一方、感染個体数は少数だったが、ほぼ毎月確認されおり、感染率は 0~12.4%と比較的低い比率で推移していた。しかし、2012 年 5 月に 24 頭(12.44%)、2013 年 6 月に 29 頭(10.90%)、2014 年 6 月に 20 頭(9.22%)と他の月と比べて増加しており、平均値(3.36%)と比較すると約 3 倍にまで上昇する傾向がみられた。小笠原は 5 月頃に降水量が多く、感染個体の排出物や死体から微胞子虫が水流によって拡散しやすい状況になっていると考えられる。また当地域は多湿な気候であるため、微胞子虫の乾燥を防いで胞子の活性を維持する要因になっていると考えられる。

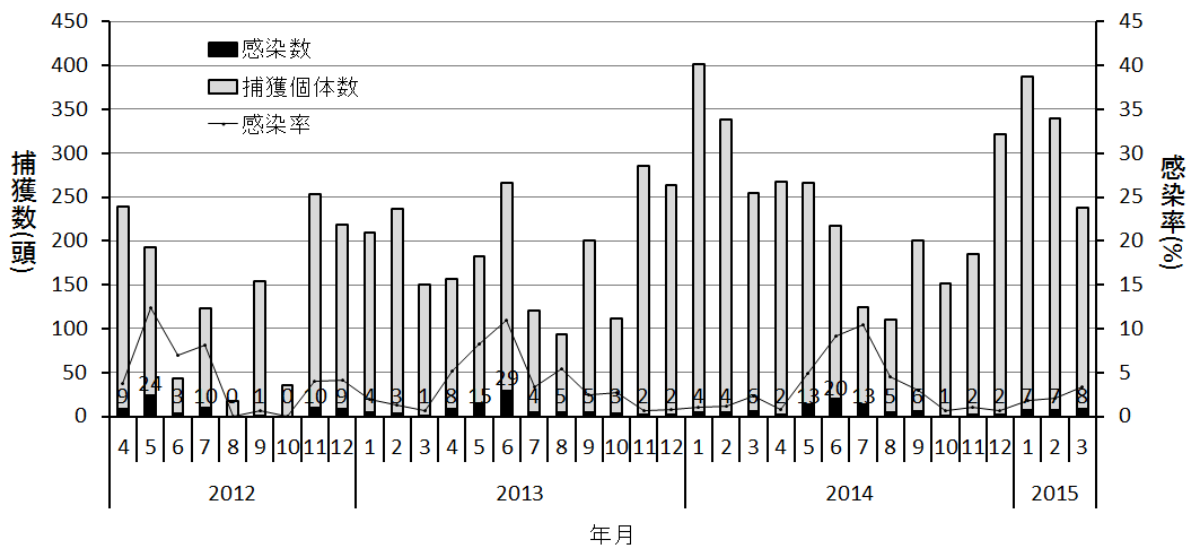


図1 ハスモンヨトウの捕獲数と感染個体数の推移

### 3. SSU rRNA 遺伝子配列解析

分離株の系統関係を明らかにするため SSU rRNA 遺伝子配列解析を行った。微胞子虫の SSU rRNA 遺伝子配列は約 1,200bp 程度と他の真核生物と比較して短い配列である。解析には 2012 年度に検出した微胞子虫株から胞子の形態的特徴によって 12 株を選出して行った。解析の結果、*Nosema* 属(1 株)、*Vairimorpha* 属(8 株)、*Pleistophora* 属(2 株)、*Trachipleistophora* 属(1 株)の 4 属が検出された。*Nosema* 属に収束した 1 株は、カイコに感染してカイコ微粒子病を引き起こす *N. bombycis* と同じクラスターに収束したため、近縁種であると示された。*Vairimorpha* 属に収束した株は 8 株あり、配列が一致する株もあったことから一部は同一種であると考えられた。また *Trachipleistophora* 属は国内のチョウ目昆虫から分離された初めての事例となる。本研究の結果から、分離株は複数系統が含まれており、当地域における微胞子虫は多様性に富んでいることがわかった。

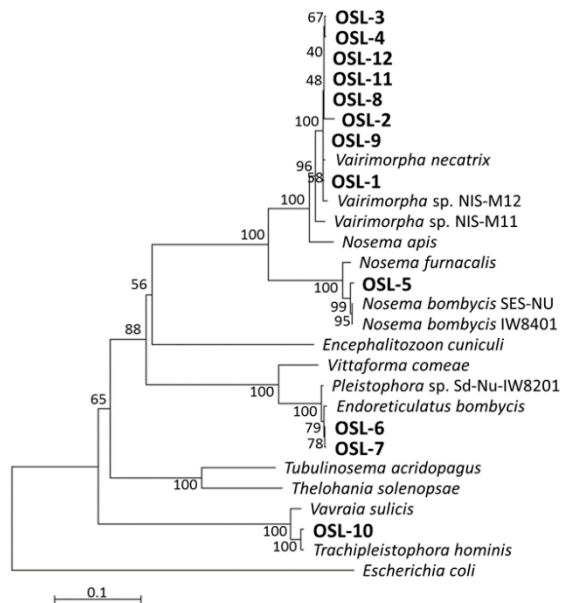


図2 SSU rRNA遺伝子配列解析による分離株の系統樹

### 4. 3種のチョウ目昆虫に対する感染性の差異

分離株のチョウ目昆虫に対する感染性と、どの部位に感染しているのか確認するために感染実験を行った。供試株は配列解析で使用した 12 株を使用し、ハスモンヨトウとオオタバコガ、カイコの 3 種のチョウ目昆虫に接種した。ハスモンヨトウは供試株の分離宿主であり、オオタバコガはハスモンヨトウと同様に広食性の農業害虫である。また、カイコは繭から生糸を生産する家畜化された昆虫である。カイコが微胞子虫に感染すると微胞子虫病を引き起こし、発育遅延や致死させるため生糸の生産量や品質に大きな被害を

生じることがある。分離株が益虫に病気を引き起こす株であるか把握する必要があるため、カイコに対する感染性も調査した。各々の 2 齢幼虫に一度だけ微胞子虫胞子を加えた人工飼料を与え経口感染させた。接種飼料をすべて食べた個体は別容器に移して健全な飼料を与えて 16L8D 27°C で飼育した。その後、成虫へ羽化あるいは死に至るまで経過観察を行った。解剖する個体は終齢幼虫を使用し、血球・神経球・気管・マルピーギ管・脂肪体・絹糸腺・中腸皮膜・生殖腺の各部位を摘出して感染の有無を確認した。

感染実験の結果、12 株中 11 株が複数の昆虫に感染した。SSU rRNA 遺伝子配列解析で *N. bombycis* と近縁だった株は 3 種すべての宿主へ感染することが確認されたが、カイコに対する致死性は確認されなかった。このことから *N. bombycis* とは致死性の異なる株であることが示された。*Vairimorpha* 属に分類された株は、ハスモンヨトウにのみ感染した株など、宿主によって感染性に違いがみられた。軽度感染しかない株も含まれていたが、一部はハスモンヨトウやオオタバコガに重度感染することを確認し、終齢幼虫までに致死させる株が含まれていた。このことから、*Vairimorpha* 属は配列解析では 8 株含まれていたが、分離株は複数種が存在していることが示唆された。*Pleistophora* 属の株はハスモンヨトウとオオタバコガに感染し、中腸でのみで胞子が確認されたことから部分感染する株であることが示された。*Trachipleistophora* 属の株は 3 種に感染し、特にカイコに対して重度の感染が確認した。絹糸腺では感染部位が白濁し、組織が肥大化している様子が観察された。

## 5. 胞子形成様式による系統間の比較

微胞子虫の発育段階様式は種によって異なるものの、栄養繁殖期、胞子形成期の 2 ステージに分けることができる。野外の自然環境では主に胞子で存在しており、宿主細胞内に進入すると増殖を開始して、栄養繁殖期から胞子形成期へと移行する。これらのステージは主に属レベルで特徴が分けられており、胞子の形態や胞子形成期に形成される胞子の胞子数などから区別することができる。胞子は位相差顕微鏡を使用して形状と長径・短径を計測した。各発育ステージを観察する標本は、感染実験で摘出した感染している器官のなすりつけ標本を作製し、ギムザ染色して生物顕微鏡で観察した。

観察の結果、胞子の形態は SSU rRNA 遺伝子配列解析で分類した 4 属と一致する特徴が観察できた。胞子は *Nosema* 属、*Pleistophora* 属、*Trachipleistophora* 属が卵円形で、*Vairimorpha* 属は長楕円形であった。卵円形の 3 属は胞子サイズが異なり、*Pleistophora* 属 < *Nosema* 属 < *Trachipleistophora* 属であった。胞子形成期は *Nosema* 属と *Vairimorpha* 属が 2 核性の遊離胞子を形成した。*Pleistophora* 属と *Trachipleistophora* 属はパンスポロプラスト膜という袋状の膜の中で複数の胞子を形成している様子が確認され、16~36 個の胞子を形成した。

## 6. 総括

東京都小笠原諸島父島においてハスモンヨトウを捕獲し、感染個体から微胞子虫を分離した。2012 年 4 月から 2015 年 3 月まで行い、3 年間のハスモンヨトウの発生消長と微胞子虫の感染動態を調査した。当地域ではハスモンヨトウが一年中発生しており、感染個体もほとんど毎月確認されている。捕獲数は毎月多く 8 月頃に低下した。感染率は 5~7 月頃に上昇する傾向がみられた。

2012 年度に分離した 74 株の中から特徴的な 12 株を選出し、遺伝子解析と 3 種のチョウ目昆虫に対する感染実験を行った。SSU rRNA 遺伝子配列解析では分離株には 4 属の系統が含まれていることが確認され、感染実験からは各属の胞子の形態の特徴と胞子形成様式を観察した。*Nosema* 属に分類されたのは 1 株で、分離株の中では中サイズで卵円形の胞子をしており、胞子形成は一つずつ別々に形成された。*Vairimorpha* 属は 8 株で長楕円形をしており、胞子形成は *Nosema* 属と同様であった。*Pleistophora* 属は 2 株で、小サイズの卵円形をしており、パンスポロプラスト膜の中に 16~36 の胞子を形成した。

*Trachipleistophora* 属は大サイズの卵形をしており、孢子形成は *Pleistophora* 属と同様であった。4 属に分類された分離株の配列解析と形態的特徴は一致しており、当地域における微孢子虫株の多様性が示された。

また感染実験では、宿主による感染性の相違ならびに感染部位について調査した。*Nosema* 属の株は、配列解析でカイコ微粒子病の病原微生物 *N. bombycis* と同じクラスターに収束したが、カイコに感染はするものの感染率は低く致死性は確認できなかったため、類似した別系統であると考えられた。*Vairimorpha* 属の 8 株は、いくつかの株が異なる感染性を示したことから、複数の系統が含まれていることが示唆された。一部の株がハスモンヨトウとオオタバコガに対して重度感染する株があり、これらは微生物防除資材として活用できる可能性がある。*Pleistophora* 属株はハスモンヨトウとオオタバコガに感染し、主に中腸が部分感染する株であった。*Trachipleistophora* 属株は 3 種に感染するが、特にカイコに対して重度感染し、絹糸腺は白濁して肥大化させることから、繭生産上、悪影響を与える恐れもある株であることが示唆された。*Trachipleistophora* 属の微孢子虫株は国内のチョウ目昆虫から分離された初事例となる。