

論文審査の結果の要旨

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

審査委員：(主査)	教授	岩野秀俊
(副査)	教授	岩田隆太郎
	教授	光澤浩
	准教授	畠山吉則

本論文は、昆虫感染性の微胞子虫から微生物防除資材となりうる株を検索することを最終目的とし、野外チョウ目昆虫から新規微胞子虫の検索と、分離株の系統関係調査および性状調査を行ったものである。小笠原諸島父島で捕獲されたハスモンヨトウの発生活長とともに微胞子虫の感染率を調査し、感染体から分離した微胞子虫株の SSU rRNA 遺伝子配列解析とチョウ目昆虫に対する感染性の調査および胞子形成様式の観察を試みている。以下に、本論文の内容とともに審査結果を記載した。

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。昆虫感染性の微胞子虫は感染して致死させる株も存在するため、近年では微生物農薬として活用することが期待されており、すでに *Antonospora locustae* は北米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伝播に加えて垂直伝播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。

1章 ハスモンヨトウの発生活長および感染率調査

小笠原諸島のハスモンヨトウに対する発生活長および微胞子虫の感染動態を明らかにするため、小笠原亜熱帯農業センターの施設内の圃場に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2012年4月から2015年3月までの3年間行った。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されており、1年中発生していることが示された。発生活長では、捕獲数は毎年11月から翌年5月まで多く、7~10月頃に減少している。捕獲数が減少する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障害が影響している可能性が考えられる。感染個体数は少数だったが、ほぼ毎月確認されており、感染率は0~12.44%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。

2章 SSU rRNA 遺伝子配列解析

解析には 2012 年度に検出した微胞子虫株から胞子の形態が特徴的な 12 株を使用した。分離株の系統学的位置を特定するため、SSU rRNA 遺伝子配列解析を行った。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、近縁種であると思われた。*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が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が多様性に富んでいることが示唆された。

3章 3種のチョウ目昆虫に対する感染性の差異

分離株 12 株のハスモンヨトウ、オオタバコガ、カイコに対する感染性を調査するため、各昆虫に対する接種実験を行い、各チョウ目昆虫に対する感染の有無と感染体を解剖して複数の組織を抽出し、感染部位の特定を行った。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* と近縁であった株は 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。*Vairimorpha* 属は配列解析では 8 株含まれていたが、分離株に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。これらの結果から、分離株には農業害虫であるハスモンヨトウとオオタバコガに感染性を示す株が多く含まれていることから、微生物防除資材として活用できる可能性のある株が含まれていることを示唆した。

4章 胞子形成様式による系統間の比較

形態学的特徴から分離株の系統関係を調査するため、微胞子虫の胞子形成時における発育段階様式を観察した。微胞子虫の発育段階様式は栄養繁殖期、胞子形成期の 2 相に分かれており、属ごとに特徴付けられている。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* 属はパンスポロブ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、16~30 個以上の胞子を形成した。

5章 総合討論

SSU rRNA 遺伝子配列解析ならびに胞子形成様式の形態的特徴を観察の結果から、分離株には *Nosema* 属、*Vairimorpha* 属、*Pleistophora* 属、*Trachipleistophora* 属の 4 属が存在しており、当地域のハスモンヨトウに感染性を有する微胞子虫は種多様性に富んでいることが示唆された。*Trachipleistophora* 属の微胞子

虫株は、すでに哺乳類のテンレックからの報告事例はあるものの、国内のチョウ目昆虫から分離された初の事例であり、小笠原諸島特有の系統であると考えられた。感染実験の結果から、農業害虫であるハスモンヨトウやオオタバコガに感染し、殺虫性を示す株が確認された。特に *Vairimorpha* 属の2株は、2種の農業害虫に対して強い殺虫性を示すことが示された。これらの株は有用な微生物防除資材として活用できる可能性が示唆された。

以上、本研究は小笠原諸島父島のハスモンヨトウに対する発消長および微胞子虫の感染動向調査によって微胞子虫の個体群動態の一端を解明するとともに、分離株の系統関係および複数のチョウ目昆虫における感染性を明らかにした。本研究結果から、一部の分離株は新規の害虫防除資材として活用できる可能性を示唆した。また、本論文における微胞子虫の感染動態と分離株の系統解析結果は、査読付きの原著論文として *Journal of Insect Biotechnology and Sericology* 誌に掲載されており、学術的な意義があると判断される。よって、本論文は博士（生物資源科学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成 28 年 2 月 1 日