

論文の内容の要旨

氏名：中村 春花

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：昆虫感染性大型微胞子虫の性状解明に関する研究

緒言

近年、総合的病害虫管理 (IPM)の推進が図られており、化学農薬の使用量を低減して効率よく活用するための技術として、生物的防除の普及が期待されている。

生物的防除への活用を期待されている微生物のひとつに、微胞子虫が挙げられる。微胞子虫は、現在 1,500 種ほど報告されており、属や種によって異なる特性を有する。これまで微胞子虫を用いた微生物農薬の製剤化の障壁となっている課題の一つに保存条件の問題がある。微胞子虫は一般的に生理食塩水中で保存されるが、塩は製剤化に必要な他の化合物との相互作用を起こしやすい。そのため、製剤化の課題解決には塩をもちいずに保存可能なものなど、今までにない特性を持つ微胞子虫の検出・研究が必要である。

2012年に小笠原諸島でハスモンヨトウの捕獲調査の結果から微胞子虫が分離された。分離微胞子虫株のうちの1株は、既知微胞子虫株と比べて極めて大型の胞子サイズを有する *Trachipleistophora* 属微胞子虫と推定された。それ以降、大型サイズの微胞子虫は小笠原諸島以外の国内地域で相次いで分離報告された。しかし、昆虫感染性 *Trachipleistophora* 属微胞子虫の詳細な性状についての報告例は少なく、既知株とは異なる特性を持つ可能性もある。これら大型サイズの微胞子虫株の詳細な調査を実施することは、新たな生物防除製剤の開発と IPM への活用につながる。そこで、本研究では日本国内で分離された大型微胞子虫の生物学的特性を複数株精査して比較を行った。

Trachipleistophora haruka の孵化特性

微胞子虫は宿主感染時に孵化という過程を経て宿主細胞に侵入する。孵化は K^+ や pH の変化などの刺激で生じるため、胞子の保存の際には生理食塩水が用いられる。供試微胞子虫株には、2012年に小笠原諸島で分離された *Trachipleistophora haruka* を用いて、胞子を生理食塩水で懸濁して 4°C 条件下で保存したところ、孵化が確認された。また、4°C 下で保存した胞子液を常温の条件下にさらすと胞子が孵化した。このように、本供試株の孵化特性は既知の微胞子虫と異なると考えられた。次に、供試株の孵化特性を検証するため、実験対照区として微胞子虫 *Nosema bombycis* (*Nb*) を用いて、4°C および 25°C の条件下で蒸留水 (D.W.)、生理食塩水 (NaCl)、KOH、KCl+H₂O₂ でそれぞれ孵化処理を行い、孵化率を測定した。実験は3反復行った。

その結果、*T. haruka* は、25°C 条件下で NaCl による孵化処理を行った場合、 K^+ を含む KOH、KCl+H₂O₂ による孵化処理と同様に孵化した。従来の通常の孵化処理では温度による孵化率の差異はなかったが、NaCl による孵化処理では、4°C 条件下よりも 25°C 条件下の方で孵化率が高く、温度も胞子の孵化に影響を与えていることを示している。このように、*T. haruka* と *Nb* の孵化特性は異なっており、*T. haruka* の孵化には K^+ 以外に Na^+ と温度が関与していた。この生理食塩水による孵化は従来の微胞子虫の性質とは異なるため、従来とは別の保存条件が適する可能性を示すものであった。

チョウ目昆虫以外からの大型微胞子虫株の検索

前項に示したように、2012年に初めて日本で確認された *T. haruka* は特異な孵化特性を有していた。そこで分離した微胞子虫と同様の性質を有するものが他に存在しないかを検証する必要がある。そこで、*Trachipleistophora* 属微胞子虫の特性をさらに解明するために、チョウ目以外の昆虫からの昆虫感染性大型微胞子虫の分離を試みた。

2014年に捕獲されたトンボ目昆虫を対象に微胞子虫の感染動向を調査した結果、4株が分離され、分離株の形態学的、分子系統学的位置の推定を行った。その結果、調査対象とした4株(FOA株)はすべて大型であるが、それぞれ胞子サイズが異なり(図1)、遺伝子解析により3属のクラスターに分類された(図2)。その中から、遺伝子解析により *Trachipleistophora* 属のクラスターに分類され、新種である可能性が示唆された分離株(FOA-2014-10)を選抜し、以降の研究に用いた。

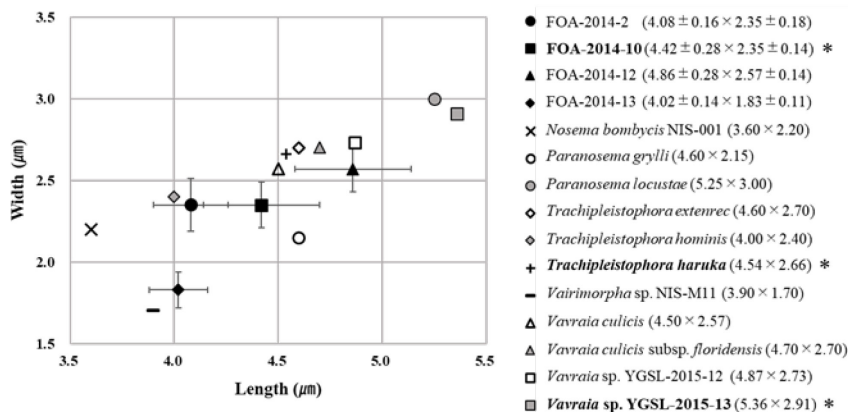


図1 供試微胞子虫株と既知株の胞子サイズ

*は以下の本研究における供試微胞子虫株を示した。括弧内の数値は胞子サイズの長径×短径(μm)である。

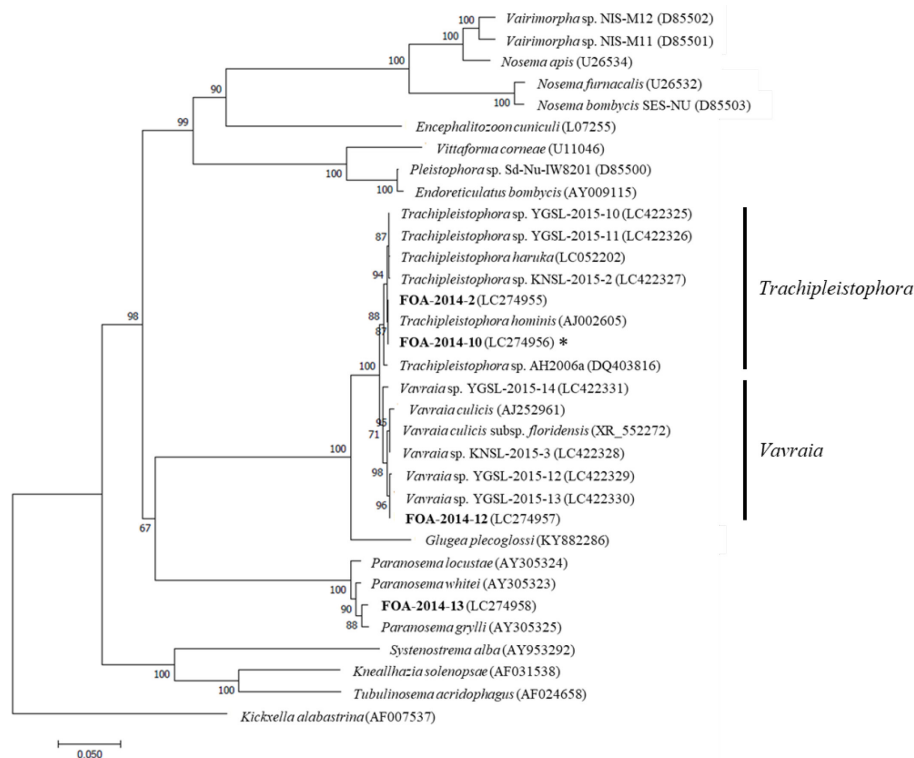


図2 トンボ由来微胞子虫株の系統樹

*は以下の本研究における供試微胞子虫株を示した。

他の昆虫感染性大型微胞子虫の孵化特性と比較

T. haruka が既知株とは異なる特異な孵化特性を有していたことから、他の昆虫感染性大型微胞子虫の孵化特性を調査した。供試微胞子虫株には、2014年にシオカラトンボより分離された *Trachipleistophora* sp. FOA-2014-10 (FOA-2014-10) と 2015年にハスモンヨトウより分離された *Vavraia* sp. YGSL-2015-13 (YGSL-2015-13) を用いた。この2株と実験対照区として *Nb* を用いて、*T. haruka* と同条件で孵化特性を調査、比較した。

FOA-2014-10 と YGSL-2015-13 は、*T. haruka* と同様に 25°C 条件下の NaCl で孵化を確認した (図 3)。一方で、FOA-2014-10 は KOH による処理の孵化率が低かった。以上の結果から、FOA-2014-10 と YGSL-2015-13 の孵化特性には *T. haruka* と同様に K⁺ 以外に Na⁺ と温度が関与していた。これらの結果より、調査した大型微胞子虫はいずれも Na⁺ を含まない条件での保存が求められ、従来とは異なる保存条件が必要となる。

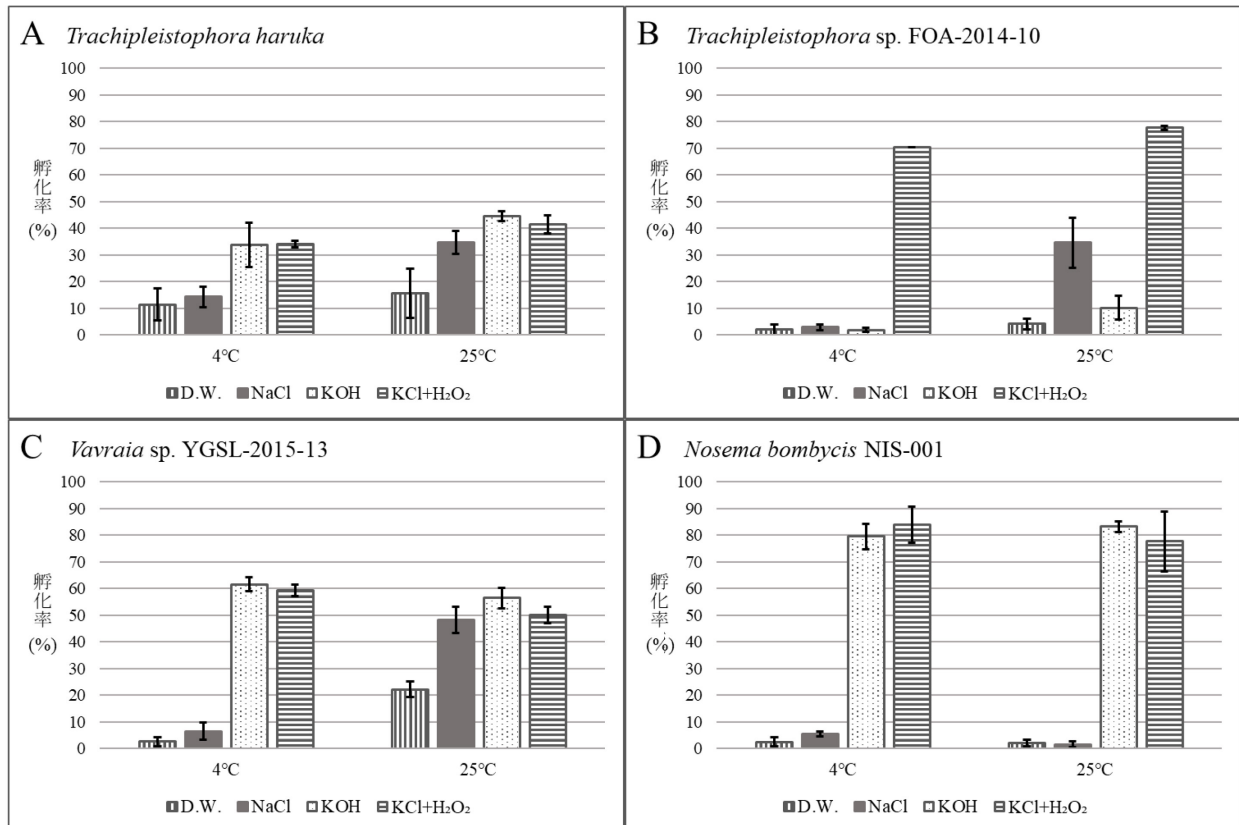


図 3 供試微胞子虫株の孵化率の比較

A は *Trachipleistophora haruka*、B は *Trachipleistophora* sp. FOA-2014-10、C は *Vavraia* sp. YGSL-2015-13、D は対照区の *Nosema bombycis* NIS-001 の 4、25°C における各条件下の孵化率を示した。

昆虫感染性大型微胞子虫の孢子形成様式

分離微胞子虫株を昆虫培養細胞に接種し、孢子形成様式を調査した。供試微胞子虫株には 3 株と、実験対照区として *Nb* を用いた。孢子液を細胞に接種後、感染細胞は 27°C で培養し、経過時間ごとに標本を作製経過時間ごとに発育ステージを観察した。

その結果、各発育ステージの推移を比較すると、供試微胞子虫 3 株は、*Nb* よりも栄養繁殖期から孢子形成期への発育にかかる時間が長く、孢子形成に長時間を要した。また、*T. haruka* と他の供試微胞子虫 2 株の孢子形成に要する時間を比較すると前者の方が長時間であり、株間にも相違が認められた。*T. haruka* と FOA-2014-10 の孢子形成様式は、孢子形成時に出現する外膜内に 2~32 個の単核性孢子形成する *Trachipleistophora* 属の孢子形成様式と近似していることが示唆された (表 1)。YGSL-2015-13 は、外膜内に 8・16・32 個の単核性孢子形成するという *Vavraia* 属微胞子虫の孢子形成様式に近似していた (表 2)。しかし、*T. haruka* では栄養繁殖期、FOA-2014-10 と YGSL-2015-13 では孢子形成期において従来の報告例にないステージを確認した。

表1 *Trachipleistophora* 属微胞子虫の孢子形成様式の観察結果・比較

	<i>Trachipleistophora hominis</i>	<i>T. haruka</i>	FOA-2014-10
孢子の核数	単核	単核	単核
形成孢子数(spore)	2~32	8~27	7~32
パンスポロプラスト膜の有無	有	有	有

Trachipleistophora 属のタイプ種として Hollister *et al.* (1996)より *T. hominis* を示した。

表2 *Vavraia* 属微胞子虫の孢子形成様式の観察結果・比較

	<i>Vavraia culicis</i>	YGSL-2015-13
孢子の核数	単核	単核
形成孢子数(spore)	8・16・32	16~28
パンスポロプラスト膜の有無	有	有

Vavraia 属のタイプ種として Weiss and Becnel (2014)より *V. culicis* を示した。

総括

本研究では、昆虫感染性大型微胞子虫の生物学的特性を明らかにするために、孵化特性検証と細胞接種実験による孢子形成様式の観察を行った。孵化特性の検証より、供試した大型微胞子虫3株の孵化には K^+ 以外に Na^+ と温度が関係していた。これまで、微胞子虫は生理食塩水のみでの処理では孵化しないと報告されている。しかし、供試した3株の孢子は $25^{\circ}C$ 条件下で生理食塩水のみで孵化を確認しており、既知株にはない特殊な性質を有していた。この結果より、生理食塩水で孵化をするのは大型微胞子虫の特徴となる可能性が示唆された。これは、従来にはない孵化特性であるため、IPMに適した製剤化を目指す際の問題解決の糸口となる可能性がある。本研究では、同属間、供試株間においても孵化特性の違いを確認した。細胞接種実験より、供試した微胞子虫の細胞内における各発育ステージの推移を比較した結果、2属の昆虫感染性大型微胞子虫の孢子形成には、*Nosema* 属微胞子虫よりも長時間を要することが示唆された。それぞれ3株ともに既知株とは異なる報告例のない形態を確認した。DNA配列による系統解析でも、これらの大型微胞子虫は類縁関係が高いことが示唆された。これらの結果より、供試株は新属の可能性が示唆された。さらに本研究で対象とした昆虫感染性大型微胞子虫の属の定義の再検討が必要と考えられる。このような新たな特性を持つ微胞子虫が発見されたことは、微胞子虫を用いた生物防除剤開発の可能性拡大につながると考えられる。