

平成 22 年 6 月 3 日現在

研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2008～2009
 課題番号： 20770193
 研究課題名 (和文) アザミウマの性決定に関する基礎的研究
 研究課題名 (英文) Basic research on the sex determination in thrips
 研究代表者
 田上 陽介 (TAGAMI YOHSUKE)
 静岡大学・農学部・准教授
 研究者番号： 60426476

研究成果の概要 (和文)：

アザミウマの性決定メカニズム解明のための基礎的研究として、数種アザミウマの倍数性確認手法の開発を行い、共生細菌の数種アザミウマでの感染の影響を明らかにした。その結果、フローサイトメーターにより複数個体を用いることでの倍数性確認手法を確立することが出来た。共生細菌 (*Wolbachia*) に感染しているクリバネアザミウマの感染の影響を調査した結果、*Wolbachia* によりクリバネアザミウマが産雌性単為生殖化していることを明らかにした。その他用いた数種アザミウマについて、共生細菌感染の有無やその影響が異なることが明らかになった。大量飼育法はすでに確立しており、これらアザミウマを比較することで、性決定メカニズム解明におおいに寄与出来ると考えられる。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, I was developed the simple method of ploidy determination in thrips species and also investigated the effects of infection of intracellular symbionts. The flow-cytometry techniques can easily research the ploidy levels of examined thrips species. The banded greenhouse thrips, *Hercinothrips femoralis* (Reuter), infected to *Wolbachia* endosymbiont. *Wolbachia* induces thelytokous reproduction to the *Hercinothrips femoralis*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：アザミウマ、性決定、共生細菌、倍数性

1. 研究開始当初の背景

ハチ目、アザミウマ目、アブラムシ、コナジラミ等の昆虫の性決定様式は単数2倍体型といわれる。この生殖様式では、通常未受精の単数体は雄となり、受精した2倍体は雌となる。性の進化を明らかにする上で、どのようにして単数体が雄になり、2倍体が雌になるというしくみが進化したのか、また、なぜ昆虫の一部のグループのみが単数2倍体型の性決定様式を進化させてきたのかといった疑問が残されている。

単数2倍体型の昆虫の中で、ハチ目が最も性決定メカニズムに関する研究が進んでいる。ハチ目の性決定メカニズムでは、ミツバチにおいて性決定に関わる遺伝子が同定された。それにより、CSD（相補的遺伝子）説と呼ばれる性決定説が適用されることが分子レベルで示された (Beye et al., 2003)。しかし、CSD 説ではミツバチ以外のすべてのハチ目昆虫に当てはめることができないことが交配実験により過去に示されており、ミツバチ以外のハチ目昆虫の性決定メカニズムを補完するため、他にいくつかの性決定説が出されている (総説：田上・三浦, 2007)。

他の単数2倍体型昆虫では、アブラムシがXX/XO型の性染色体による性決定を持つとされている (例えば Wilson et al., 1997)。しかし、アザミウマについては性決定メカニズムに関する研究がなされていないのが現状である。アザミウマは単数2倍体型昆虫の中では比較的祖先的である。そのため、単数2倍体型の性決定様式がどのように進化したのかを明らかにするのに適した生物といえる。

近年、多くの昆虫ではその細胞内に共生細菌が存在していることが明らかとなってきた。これらの共生細菌は宿主昆虫の生殖を様々な形で操作している。特に単数2倍体型昆虫では宿主を産雌性単為生殖化する例が多く見つかっている。この場合、共生細菌が存在することで宿主昆虫は未交尾でも雌を産むようになる。このような関係は50種以上で確認されているが、ほとんどはハチ目昆虫についてである。アザミウマについてはこれまで *Wolbachia* に感染することで産雌性単為生殖化している種はわずかに見つかっているのみである。また、共生細菌の存在は調べられていないものの産雌性単為生殖を行う種はいくつかのアザミウマで知られている。

アザミウマの飼育法についてはいくつかの農業害虫を中心に確立されている。今回供

試するクリバネアザミウマやトラフアザミウマ等のアザミウマは効率良く大量に増殖飼育する手法を開発しており、本研究で必要な抗生物質の投与試験や交配試験等の試験を行うことが可能なアザミウマである。

2. 研究の目的

アザミウマの性決定メカニズムを明らかにする上で、重要な視点として、(1) 倍数性、(2) 共生細菌の影響、(3) 性決定関連遺伝子の探索、が挙げられる。

(1) 倍数性

アザミウマを含めいくつかの目の昆虫では、単数2倍体型の性決定様式を持つことが知られている。この性決定様式では未交尾では単数体の雄、交尾・受精することで2倍体の雌を産む。したがって、倍数性の判定をおこなうことにより、発育段階のどのステージでも雌雄の判別が可能となるため、倍数性の判定は性決定メカニズムを明らかにするうえで重要な項目となる。染色体数の測定は簡便な倍数性判定のツールとなるが、アザミウマは体サイズが小さいこともあり、雌雄の倍数性に関わる染色体数からの報告はほとんどなされていない。

さらに後述するように、いくつかのアザミウマ種では共生細菌に感染しているが、共生細菌は宿主の倍数性を操作することで、性決定メカニズムに関わっていることが報告されている。したがって、共生細菌との関係に関しても倍数性の判定は重要となっている。

以上の理由から、本研究では、まずアザミウマの倍数性を判断する手法の確立を目的とした。

(2) 共生細菌の影響

アザミウマを含む多くの昆虫では共生細菌の感染が報告されている。これらの共生細菌のうち、単数2倍体型の昆虫に感染している共生細菌では、宿主の倍数性を操作することで、性を制御していると報告されている。したがって、共生細菌がアザミウマに感染する影響を調査し、共生細菌が宿主昆虫に何をしているかを明らかにすることで、性決定メカニズムの解明につながると考えられる。そこで、本研究ではまずはアザミウマに共生細菌が感染している種の探索を行い、さらに共生細菌により産雌性単為生殖化しているか調査した。

(3) 性決定関連遺伝子の探索

近年多くの昆虫で性決定に関わる遺伝子である、*dsx* や *sxl* 等が見つかっており、ミツバチからも *dsx* が同定された (Beye et al., 2003)。また、性決定関連遺伝子として *csd* も見ついている。アザミウマで性決定関連遺伝子に関する研究はこれまでなされていない。そこで、性決定関連遺伝子を明らかにし、ハチ目と比較することで、性決定メカニズムがどのように進化してきたのかを遺伝子レベルで明らかにすること、および今後性決定カスケードを解明する上での手がかりとすることを目的として本研究を行う。

調査によってこれらの基礎データを得、さらに詳細な交配実験、性決定関連遺伝子の探索などを進めていくことにより、アザミウマの性決定メカニズムを明らかにし、ハチ目との差異から単数2倍体型の性決定メカニズム進化の要因を明らかにする、そのための基礎的データを得ることを本研究の目的としている。

3. 研究の方法

(1) 倍数性

倍数性の確認には、各種アザミウマを供試虫とし、染色体の観察とフローサイトメーターの両手法を用いた。染色体の観察は主に蛍光色素である DAPI による染色と蛍光顕微鏡を用いた観察をおこなった。

フローサイトメーターは供試する昆虫のステージ (幼虫か成虫か等) にとらわれずに行うことが可能な試験であるが、挙雑物により、倍数性の確認が確実にできない可能性がある。本研究ではセルアナライザー (EPICS XL) を使い、解析を行った。

(2) 共生細菌の影響

共生細菌感染の影響については産雌性単為生殖を行うクリバネアザミウマ、トラフアザミウマとネギアザミウマを主要な供試虫とした。まず、これらの供試虫について共生細菌感染の有無を共生細菌に特異的なプライマーを用いて PCR 反応により判定した。昆虫の共生細菌は、半数以上の種が感染していると言われている *Wolbachia* が主であるが、他の細菌でも幅広い目の昆虫に感染していることが明らかになっている。これらの細菌も含めいくつかの細菌について特異的なプライマーから PCR による検出をおこなった。感染が確認された種については塩基配列を求めた。

共生細菌の感染が確認された種 (クリバネアザミウマとトラフアザミウマ) については抗生物質を用いて非感染系統を作出した。本研究で用いるアザミウマ類は植物上で飼

育を行う。昆虫の共生細菌を宿主から除去するには、通常抗生物質を餌や蜂蜜に混ぜて与え、取り除く。しかし、本試験で用いるアザミウマは植食性で蜂蜜からの取り込みも不確かであった。そのため、ハモグリバエで確認した手法である抗生物質殺菌剤の寄主植物への散布法を用いた。共生細菌の除去は共生細菌に特異的なプライマーによる PCR 法で判定した。作出した非感染系統の性比を確認し、さらに雄が産まれた場合は感染系統との交配試験を行った。

(3) 性決定関連遺伝子の探索

既存の遺伝子 *dsx* を検出するプライマーは過去に設計している。そのプライマーを用い、PCR 法により検出した。また、既存の配列を元に保存性の高い領域からプライマーを設計し、PCR 法により検出を試みた。供試昆虫には飼育していないアザミウマも含め6種を用いた。

4. 研究成果

(1) 倍数性

まず染色体の観察を行った。しかし、確実に1個体のアザミウマから観察することは難しく、また分裂中期の染色体が見えやすいステージを同定することも難しかった。汎用的な手法の開発を目指していたため、染色体の観察は1年目で終了し、フローサイトメーターでの手法開発に取り組んだ。

フローサイトメーターによる倍数性の確認では、1個体での倍数性の判定手法を確立するには至らなかったが、数個体を用いることでクリバネアザミウマ、ミナミキイロアザミウマ、ヒラズハナアザミウマで検出することが出来、クリバネアザミウマでは雄が単数体、雌が2倍体であることを確認出来た。以上から抽出方法に再検討の余地は残されているものの、フローサイトメーターによる倍数性の検出は、アザミウマの倍数性を明らかにする上で重要なツールとなると考えられた。

(2) 共生細菌の影響

共生細菌の感染確認の結果、産雌性単為生殖を行う種 (クリバネアザミウマ、トラフアザミウマとネギアザミウマ) 以外では共生細菌 (*Wolbachia*) の感染は確認出来なかった。また、産雌性単為生殖を行う種についても、ネギアザミウマでは *Wolbachia* 以外の共生細菌も含め、共生細菌の感染は確認されなかった。

抗生物質殺菌剤を用いることで、クリバネアザミウマとトラフアザミウマの両種で非感染個体を作成することが出来た。クリバネアザミウマでは共生細菌

を取り除くことで雄になることが明らかとなった。交配試験を行ったが、非感染雄には交尾・受精能力は認められなかった。

トラファザミウマにおいて抗生物質の散布により作出した非感染個体は雌であり、雄が発生することは全くなかった。したがって、トラファザミウマに感染している *Wolbachia* は宿主を産雌性単為生殖化しているわけではないことが明らかとなった。トラファザミウマの *Wolbachia* が宿主に他の影響を与えているのかは明らかにすることができなかった。

以上の結果からアザミウマには共生細菌が関与することで産雌性単為生殖化する種もあるが（クリバネアザミウマ）、共生細菌は存在するものの、共生細菌には関わりがなく、産雌性単為生殖化する種（トラファザミウマ）や、共生細菌が存在しないが産雌性単為生殖化する種（ネギアザミウマ）が存在することが明らかとなった。これらの種を用いて比較調査を行うことで、共生細菌の影響と産雌性単為生殖化との関わりを明らかにすることが可能になる。

(3) 性決定関連遺伝子の探索

本研究で用いたプライマーではアザミウマの性決定関連遺伝子を検出することがいづれの種でも出来なかった。現在多くの昆虫で全ゲノム解析が進んでおり、単数2倍体型の昆虫ではコナジラミでも全ゲノム解析が進められている。このように他のゲノム解析が進んでいる種のDNAデータベースを参考にしながら、性決定遺伝子の中でなるべく保存性の高い領域からプライマーを作成することで、今後は性決定関連遺伝子の探索を進めていく予定である。

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 1件)

田上陽介、細胞内共生微生物による害虫防除とゲノム研究、植物防疫、査読無し、63巻、2009年、485-489

〔学会発表〕(計 1件) 招待講演

田上陽介、細胞内共生微生物による害虫防除とゲノム研究、公開シンポジウム「ポストゲノム時代の害虫防除研究のあり方」第1回昆虫ゲノム情報と総合的害虫管理技術 IPM、2009年4月24日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田上 陽介 (TAGAMI YOHISUKE)

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号：60426476

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者