

Wolbachia を利用した害虫防除技術の現状

静岡県農業試験場病害虫部 田 上 陽 介

はじめに

昆虫類は、様々な環境に適応し、広く繁栄している。その多様性ゆえに、基礎・応用両面での研究が進んでいる。昆虫は、その細胞内や細胞間に多くの微生物をとり込み、共存していることが知られている。細胞内共生微生物である *Wolbachia* は、多くの昆虫に感染し、「昆虫の生殖」を操作していることが明らかとなってきた。このため、多様な昆虫の生殖を多様な形で操作している *Wolbachia* は研究者の注目を浴び、近年 *Wolbachia* に関する研究が飛躍的に進展してきた。

一部の昆虫は農作物の害虫となり、時に農作物に大きな被害を与える。したがって、害虫は適切な手法で防除を行う必要がある。現在害虫防除は化学的防除法が中心であるが、それ以外にも様々な方法がある。例えば、不妊虫の放飼を行う遺伝的防除や、天敵昆虫類や天敵微生物などの生物農薬を利用した生物的防除など、生物を利用した防除法も広く用いられている。不妊虫放飼法では、雄を不妊化する技術が必要となり、また天敵昆虫類による防除では、天敵を大量増殖する技術が必要となる。これら技術のキーワードとして「昆虫の生殖」が上げられる。

近年、環境への負荷を低減する環境保全型の防除技術が求められている。放射線を利用した害虫の不妊化と不妊虫放飼法では、害虫を根絶することで農薬散布による防除を必要としない。また、生物農薬を利用した防除は総合的病害虫管理 (IPM) において重要な位置を占めている。これら不妊虫放飼法と生物農薬の利用においては、利用できる個別技術は確実に増加しているものの、全体的にその技術開発は十分とは言い難く、新しい防除法の開発が期待されている。「昆虫の生殖」を操作する *Wolbachia* に関する研究は新しい害虫防除技術開発の可能性を秘めていると考えられる。

本稿では、まず *Wolbachia* について紹介をするとともに、*Wolbachia* を利用した害虫防除技術開発の現状について四つのトピックスを紹介し、今後の利用可能性について報告する。

Latest Report of Insect Pest Control Techniques using *Wolbachia*.

By Yohsuke TAGAMI

(キーワード: *Wolbachia*, 細胞質不和合, 病原性, 産雌性単為生殖化, チチュウカイミバエ, ネットアイシマカ, ヒメトビウンカ)

I *Wolbachia*

Wolbachia は、 α プロテオバクテリアに属するリケッチア様の細菌で絶対寄生菌である (O'NEILL et al., 1997)。*Wolbachia* 感染は線虫、陸上甲殻類やクモ類も含め非常に多くの種類の昆虫から発見され (表-1)、その感染率は調査地域や方法によって様々であるが 17% から 76% と報告されている (WERREN et al., 1995; JEYAPRAKASH and HOY, 2000)。また、細胞質中に存在する *Wolbachia* は、通常母親から子へ経卵伝染によって垂直伝搬する。しかし、捕食などにより水平伝搬が起きることも、実験的にもまた系統関係からも示唆されている (HUIGENS et al., 2000; NODA et al., 2001)。

表-2 は *Wolbachia* による主要な宿主操作を上げている。これらの宿主操作は、主に宿主個体群中での *Wolbachia* 感染個体の頻度を上げる。そのため、宿主操作によって *Wolbachia* は自らの適応度を増すことができ、*Wolbachia* 感染個体が短期間に感染地域を拡大することが報告されている (TURELLI and HOFFMANN 1991; HOSHIZAKI and SHIMADA, 1995)。

Wolbachia の利用法は、宿主操作能力を直接利用する場合と感染地域を拡大できる性質・感染宿主の多様性を

表-1 *Wolbachia* 感染の確認されている生物

綱名	目名	代表的な文献
昆虫綱	アザミウマ目	ARAKAKI et al., 2000
	アミメカゲロウ目	WEEKS et al., 2003
	カメムシ目	NODA, 1984
	コウチュウ目	WERREN et al., 1995
	シミ目	JEYAPRAKASH and HOY, 2000
	シラミ目	KYEI-POKU et al., 2005
	シロアリ目	Lo et al., 2002
	チョウ目	WERREN et al., 1995
	トンボ目	JEYAPRAKASH and HOY, 2000
	ネジレバネ目	NODA et al., 2000
	ノミ目	JEYAPRAKASH and HOY, 2000
	ハエ目	O'NEILL et al., 1992
	ハチ目	STOUTHAMER et al., 1993
	バッタ目	WERREN et al., 1995
クモ綱	クモ目	OH et al., 2000
	ダニ目	BREUWER and JACOBS, 1996
甲殻綱		ROUSSET et al., 1992
	線虫綱	SIRONI et al., 1995

表-2 *Wolbachia* が宿主に与えている影響

宿主に与える影響	代表的な文献
生殖操作：細胞質不和合性 遺伝的雄の雌化 雄殺し 産雌性単為生殖化	BREEUWER and WERREN, 1990 RIGAUD, 1997 HURST et al., 1999 STOUTHAMER, 1997
精子間競争力の強化	WADE and CHANG, 1995
卵巣成熟の制御	DEDEINE et al., 2001
生存率の低下	TAGAMI et al., 2001
成虫での早期致死	MIN and BENZER, 1997

	感染♂	非感染♂
感染♀	○	○
非感染♀	×	○

図-1 一方性細胞質不和合

■は子孫が感染する組み合わせ、○は生存、×は死亡を示す。

利用してベクターとして用いる場合とに分けることができる。これらの利用法を用いた害虫制御技術の開発に重要な *Wolbachia* による宿主操作は、細胞質不和合、病原性と産雌性単為生殖化である。

1 細胞質不和合

Wolbachia による宿主操作の中で、現在最も利用法が考えられているのが細胞質不和合である。一方性細胞質不和合の場合で *Wolbachia* 感染個体と非感染個体の交配を例にとってみると、感染雌では感染雄・非感染雄のどちらとの交配においても、非感染雌では非感染雄との交配においてのみ産まれた子は正常に発育し、子孫を残すことができる。しかし、非感染雌と感染雄との交配では発育途中（主に卵の受精直後あるいは胚発育初期）に死んでしまうため、子孫を残すことができない（図-1）。子孫を残すことができる三つの組み合わせのうち、二つは *Wolbachia* が子孫に伝搬される組み合わせである（図-1）。したがって、野外で適応度の変わらない感染・非感染個体が共存し、ランダム交配が起きるならば、感染個体の割合が高くなる。その結果、細胞質不和合を起こす *Wolbachia* 感染個体の感染地域拡大が生じる。

2 病原性

多くの *Wolbachia* による宿主への影響は共生的もしくは片利寄生的であるが、病原性のものも知られている（MIN and BENZER, 1997）。病原性系統（wMelPop）の *Wolbachia* は、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* から見つかったものである。wMelPop はキイロショウジョウバエが成虫になると自身を宿主内（特に神経・筋肉組織）で爆発的に増殖させ、結果として宿主を死に至らしめる。その増殖の様子からポップコーンといわれている。

3 産雌性単為生殖化

ハチ目、アブラムシ目やアザミウマ目などいくつかの昆虫では、単為生殖を行うことが知られている。単為生殖は、主に未受精卵が雄になり受精卵が雌になる産雌性

単為生殖と、未受精卵が雌になる産雌性単為生殖とに分けられる。ハチ目には、*Wolbachia* に感染することで産雌性単為生殖化している種が 40 以上知られている（HUIGENS and STOUTHAMER, 2003）。これらの種では、抗生物質などで *Wolbachia* を取り除くことで雄が産まれてくる。感染個体は未受精でも雌を産みつづけることができるため、雄を必要としない。

II 細胞質不和合の利用（チチュウカイミバエ）

放射線処理などによって不妊化された雄と正常な雌が交配した場合、子孫を残すことができない。これを利用して、大量の不妊雄を放飼することで害虫を抑圧する方法が不妊虫放飼法である（総説としてニップリング, 1989）。日本では、南西諸島において不妊虫放飼法による害虫防除が行われている。

Wolbachia による細胞質不和合の場合、非感染雌と感染雄との交配では子孫を残すことができない（図-1）。したがって、感染雄は不妊化された雄と同様な個体となる。この点に注目し行われているのが、Kostas BOURTZIS 博士を中心としたヨーロッパでの研究である（ZABALOU et al., 2004）。この研究が対象としているのは世界的な大害虫であり、日本において侵入警戒調査対象害虫とされているチチュウカイミバエ *Ceratitis capitata* である。

チチュウカイミバエは、*Wolbachia* に感染していないことが明らかとなっている（BOURTZIS et al., 1994）。彼らは、ショウジョウバエの仲間である *Rhagoletis cerasi* に感染し強い細胞質不和合を起こす *Wolbachia* を、チチュウカイミバエへ移植した。その結果、*Wolbachia* を移植された系統の雄は非感染雌との交配では 100% 子孫が残せなかった（表-3）。したがって、この *Wolbachia* はチチュウカイミバエに対しても強い細胞質不和合を起こしている。

この研究では、感染雄を大量に放飼することで個体群密度の抑制に有効であることも室内実験で確認している（図-2）。これはケージ内での実験ではあるが、感染雄が非感染雄との交尾相手獲得競争に負けていないことを意味する。図-2では、例えば雌の 50 倍の感染雄を導入

表-3 Wolbachia を導入したチチュウカイミバエでの交配結果 (ZABALOU et al., 2004 を改変)

		交配 (♀×♂)		供試数	胚死亡率(%)		
未処理	非感染	×	WolMed	88.6	3,000	100 ± 0	
	非感染	×	WolMed	S10.3	3,000	100 ± 0	
	WolMed	88.6	×	非感染	3,000	16.73 ± 0.68	
	WolMed	S10.3	×	非感染	3,000	32.03 ± 0.85	
	WolMed	S10.3	×	WolMed	88.6	3,000	100 ± 0
	WolMed	88.6	×	WolMed	S10.3	3,000	100 ± 0
	WolMed	88.6	×	WolMed	88.6	3,000	64.77 ± 0.87
	WolMed	S10.3	×	WolMed	S10.3	3,000	67.25 ± 0.87
	非感染	×	非感染		3,000	12.17 ± 0.60	
抗生物質処理	WolMed	S10.3	×	WolMed	S10.3	1,890	23.44 ± 0.97
	WolMed	88.6	×	WolMed	88.6	2,283	25.10 ± 0.91

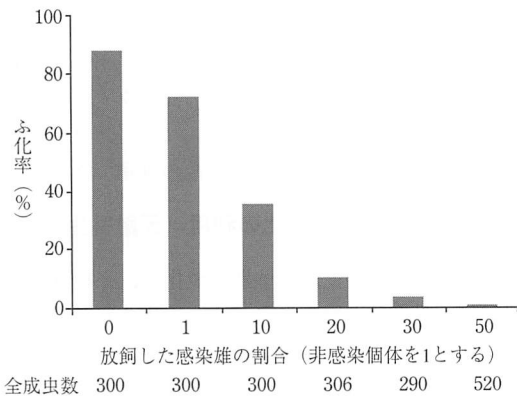


図-2 Wolbachia によるチチュウカイミバエの細胞質不適合を利用したケージによる放飼実験 (ZABALOU et al., 2004 を改変)

すると、個体群を 99% 減少させることが可能となっている。50 倍の放飼は実際の野外での個体数を考慮すると莫大な量であるが、10 倍の放飼でも半分以下に減少させることが可能である。10 倍量の放飼でも継続的に繰り返すことで根絶させることが可能であろう。

Wolbachia を感染させた個体を利用する上での問題点として、品質低下、垂直伝搬率の低下、不妊化（細胞質不適合の発現）率の低下と雌雄を判別する必要性が上げられる。放射線を用いた不妊化には、野外個体に比べ競争力（交配能力）の低下や交尾成功率の低下等品質の低下を伴うことが懸念される (HIBINO and IWAHASHI, 1989 など)。Wolbachia を利用する場合も同様の問題が生じる可能性はある。しかし、この研究で行われているようにいくつかの系統の Wolbachia を移植し、選抜することで負の影響を低減することが可能である。

Wolbachia の垂直伝搬率が低い場合、増殖中に非感染

(不妊化されていない) 雄を放飼することとなり、防除効果が下がる。この研究で用いられた系統では、垂直伝搬率はほぼ 100% であり (BOURZIS, 私信)、系統を選べば放飼した個体の中に非感染雄が含まれる危険性は低いと考えられる。

次に、不妊化率が低い場合も防除効果が上がらないため、不妊化率も重要な要素である。この研究では不妊化率は 100% であるため、不妊化率の低下によって防除効果が下がる可能性は低い (表-3)。

最も重要な問題は感染雌・感染雄の判別である。なぜなら、感染雄と同時に感染雌を野外に放飼した場合、感染雌は感染雄・非感染雄とも交尾し、子孫を残し、しかもすべての子孫が感染個体となる。したがって、野外で感染個体が広まり、感染雄を放飼する効果が全くなくなる。この問題については、現在も解決はされていない。しかし、解決につながる材料はある。放射線処理された不妊雌を放飼する場合も、防除効率の低下につながる。これは、不妊雌の放飼が不妊雄と正常雌との交尾機会を減少させることなどが原因である。そのため、雄のみを選抜する手法の開発が行われている。この選抜手法に対して、IAEA (国際原子力機関) が興味深い成果を残している (FRANZ and KERREMANS, 1994)。彼らは基礎的な遺伝学的手法と放射線照射処理によって、雌のみに変異を起こす突然変異体を作製している。それらは、蛹が白化・黒化される、プリンを添加すると死ぬ、アルコールを添加すると死ぬ、高温で死ぬといった、雄のみを容易に選抜することが可能となる変異体である。Wolbachia を感染させた系統にこのような突然変異体を利用することで感染雌を取り除くことが可能になれば、その利用価値は十分に高まると考えられる。

Wolbachia に感染した雄と放射線照射による不妊雄と

を比較した場合、*Wolbachia*に感染した雄を利用する一番の利点は、毎世代不妊処理をすることなく不妊雄と同様の効果がある個体を飼育によって得られる点にある。なぜなら、感染系統では*Wolbachia*が垂直伝搬により毎世代子孫に伝わるからである。したがって、*Wolbachia*の利用は今後不妊虫放飼法における重要な位置を占める可能性がある。

III 病原性の利用 (ネッタイシマカ)

成虫での早期致死を起こす wMelPop 系統は、その病原性を利用して昆虫媒介伝染病の病原菌伝搬を抑圧できる可能性が提案されていた(理論的研究として BROWNSTEIN et al., 2003)。Queensland 大学(オーストラリア)の Scott O'NEILL 博士の研究室がオーストラリア研究協議会の基金により行っているのは、デング熱を引き起こすネッタイシマカ *Aedes aegypti* を、wMelPop を利用して防除する研究である。

マラリア、デング熱、日本脳炎やフィラリア症などの蚊が媒介する感染症は、蚊が羽化後 8~14 日程度で媒介可能になる。したがって、蚊に wMelPop を感染させることで成虫の早期致死が起きれば、病原菌を伝搬する前に死ぬこととなる。一方、蚊は吸血後 2~3 日後に産卵を開始するため、wMelPop 感染系統は感染した子孫を残すことができる。

現在、ヒトスジシマカ *Aedes albopictus* の培養細胞に wMelPop 系統を感染させ、感染細胞を 200 回以上の継代に成功している(Cook, 私信)。また、感染細胞から *Wolbachia* を精製し、ネッタイシマカの胚および胸部へマイクロインジェクションを行うことで感染系統を作製することが試みられている(Cook, 私信)。

wMelPop 系統の *Wolbachia* を感染させることに成功した後は、細胞質不和合を起こす *Wolbachia* を感染させ、二重感染系統を作出する。すると、野外に放飼した個体のうち感染雌はデング熱を媒介しないまま子孫を残し、感染雄は非感染雌との子孫を残せないよう働く。野外の非感染個体が伝染病媒介能力を獲得後に多くの子孫を残さないのであれば(非感染個体と感染個体の適応度にあまり差がなければ)、感染個体が広まる可能性がある。

多くのウイルス病を媒介する農業害虫は、潜伏期間が短く、上記と同様の方法では効果を得ることは難しいが、ウンカやヨコバイに感染するウイルス(例えばイネ縞葉枯病、萎縮病や黒すじ萎縮病などの病原ウイルス)では潜伏期間が比較的長い。そのため、これらの昆虫に感染させることで同様の効果を得られる可能性はある。

IV ベクターとしての利用 (ヒメトビウンカ)

CCRP (Collaborative Crop Research Programs) の基金により Scott O'NEILL 博士の研究室と中国の復旦大学が共同で行っている研究では、ヒメトビウンカ *Laodelphax striatellus* によるイネ縞葉枯病(RSV: Rice Stripe Virus が病原)の防除法の開発に *Wolbachia* を利用している。

この研究では、*Wolbachia* をベクターとして用いている。まず、RSV の働きを抑える物質を産生する遺伝子(遺伝子群)を明らかにしたうえで *Wolbachia* に導入し、遺伝子組換え体の *Wolbachia* を作製する。この *Wolbachia* をウンカに感染させることで RSV に耐性をもつウンカになる。現在候補となるオリゴペプチドの絞り込みと、ショウジョウバエに感染している *Wolbachia* のヒメトビウンカへの移植に成功している。*Wolbachia* は多くの昆虫に感染していることから、ベクターとしての利用は今後発展する可能性がある。しかし、*Wolbachia* への遺伝子導入手法の確立は、今後の課題である。

V 産雌性単為生殖化の利用 (天敵寄生蜂)

Wolbachia による産雌性単為生殖化は、系統選抜、品質維持、大量増殖と放飼において天敵寄生蜂の有効な利用につながる。通常、系統選抜では交配による影響が生じる。しかし、産雌性単為生殖系統では交配を必要としないため系統選抜を行いやすい。

また、天敵寄生蜂では近親交配の影響や寄生能力の低下が品質維持のうえで懸念される。これらの点についても、交配の必要がない産雌性単為生殖系統では両性系統と比較すれば容易に品質を維持することが可能である。

大量増殖においては、もし産卵能力等に雌雄を 1:1 の割合で産む両性生殖(または産雄性単為生殖)系統と産雌性単為生殖系統に差がなければ、産雌性単為生殖系統では 2 倍の増殖力が得られる。そのためコストを半減させることができる。

天敵寄生蜂の場合、捕食性天敵と異なり天敵として役立つのは害虫に寄生・産卵する雌のみである。雌雄を 1:1 の割合で産む産雄性単為生殖の寄生蜂を用いると、放飼した個体の半分は雄のため寄生・産卵せず、害虫の密度低下に寄与しない。しかし、産雌性単為生殖系統を利用すればすべての個体が害虫防除に役立つ。以上のように様々な面から天敵寄生蜂を産雌性単為生殖化する利点が見られる。

ただし、産雌性単為生殖化系統作出には問題点もある。*Wolbachia* 感染には負の影響も知られているからであ

る。特に、産雌性単為生殖化にはその過程での生存率の低下が知られている (MIURA and TAGAMI, 2004)。しかし、負の影響も *Wolbachia* の系統によって様々である。例えば、卵寄生蜂 *Trichogramma kaykai* や *T. deion* に感染している *Wolbachia* では感染することで生存率が約 50% 近く減少するが、キイロタマゴバチ *T. dendrolimi* に感染している *Wolbachia* では生存率が高く、負の影響が少ないことが明らかとなっている (TAGAMI et al., 2001; 田上・三浦, 未発表)。したがって、感染させる *Wolbachia* の系統を選ぶことで有効な感染寄生蜂を作出することも可能と考えられる。現在、近畿中国四国農業研究センターと静岡県農業試験場において、それぞれメアカタマゴバチ *Trichogramma chilonis* とカンムリヒメコバチ *Hemiptarsenus varicornis* の産雌性単為生殖化技術の開発が行われている。

おわりに

近年 PCR 法やゲノム解析法が急速に一般化してきたことによって、*Wolbachia* による生殖操作メカニズムも徐々に解明されつつある。今後共生微生物・宿主昆虫のゲノム解析、細胞レベルでの詳細な動態解析、移植実験や昆虫細胞内での培養を利用した *in vitro* の研究が進み、*Wolbachia* による生殖操作メカニズムやそのほか様々な機能の解明を通して、害虫管理に役立つ昆虫の性質を改変する手法に関して貴重な情報が得られるであろう。その結果、害虫防除法の選択肢を増やすことができ、柔軟で応用力の高い害虫制御技術を築くことが可能となるであろう。

組換え (Genetically Modified: GM) 生物と同様にバクテリア導入 (Bacteria Infected: BI) 昆虫の利用も重要度を増すと考えられる。現在のところ遺伝子組換えや細胞融合を行わず、人為的に感染させただけの昆虫を野

外で利用する際の特別の規制はなく、ガイドラインは設けられていない。しかし、今後この問題について有識者による十分な検討が必要であろう。

なお、本稿をまとめるにあたり近畿中国四国農業研究センター・三浦一芸博士、農業生物資源研究所・野田博明博士、東京大学薬学系研究科・寺本時靖博士、静岡県農業試験場病害虫部・土着天敵プロジェクトの方々にご高閲、ご助言いただいた。また、Ioannina 大学 (ギリシャ)・Kostas BOURTZIS 博士、Queensland 大学・Peter COOK 氏には海外での *Wolbachia* 応用研究について最新の情報をご教授いただいた。ここに記してお礼申し上げる。

引用文献

- 1) BOURTZIS, K. et al. (1994): *Insect Mol. Biol.* 3: 131 ~ 142.
 - 2) BROWNSTEIN, J. S. et al. (2003): *J. Invertebrate Pathol.* 84: 24 ~ 29.
 - 3) FRANZ, G. and P. KERREMANS (1994): In *Fruit Flies and the Sterile Insect Technique*, CRC Press, Boca Raton, p. 113 ~ 122.
 - 4) HIBINO, Y. and O. IWAHASHI (1989): *Appl. Entomol. Zool.* 24: 152 ~ 154.
 - 5) HOSHIZAKI, S. and T. SHIMADA (1995): *Insect Mol. Biol.* 4: 237 ~ 243.
 - 6) HUIGENS, M. E. and R. STOUTHAMER (2003): In *Insect Symbiosis*, CRC Press, Boca Raton, p. 247 ~ 266.
 - 7) ——— et al. (2000): *Nature* 405: 178 ~ 179.
 - 8) JEYAPRAKASH, A. and M. A. HOY (2000): *Insect Mol. Biol.* 9: 393 ~ 405.
 - 9) ニップリング, E. F. (1989): 害虫総合防除の原理, 東海大学出版会, 東京, 375 pp.
 - 10) MIN, K. T. and S. BENZER (1997): *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 10792 ~ 10796.
 - 11) MIURA, K. and Y. TAGAMI (2004): *Annals Entomol. Soc. Am.* 97: 765 ~ 769.
 - 12) NODA, H. et al. (2001): *Mol. Ecol.* 10: 2101 ~ 2106.
 - 13) O'NEILL, S. L. et al. (1997): *Influential Passengers*, Oxford Univ. Press, New York, 214 pp.
 - 14) TAGAMI, Y. et al. (2001): *J. Invertebrate Pathol.* 78: 267 ~ 271.
 - 15) TURELLI, M. and A. A. HOFFMANN (1991): *Nature* 353: 440 ~ 442.
 - 16) WERREN, J. H. et al. (1995): *Proc. R. Soc. Lond. B.* 262: 197 ~ 204.
 - 17) ZABALOU, S. et al. (2004): *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 15042 ~ 15045.
- (表-1 および表-2 の文献は割愛させていただいた。)

登録が失効した農薬 (17.7.1 ~ 7.31)

掲載は、種類名、登録番号：商品名 (製造業者又は輸入業者) 登録失効年月日

「殺虫剤」

● BPMC 粒剤

17603: 三菱バッサ粒剤 (日本農薬) 2005/07/02

● プロチオホス・MPP 乳剤

17604: T-7.5 プロチオン乳剤 (井筒屋化学産業) 2005/07/04

● カルタップ・BPMC 粒剤

19282: クミアイパダンバッサ1キロ粒剤 (クミアイ化学) 2005/07/08

● DEP 粉剤

15792: 三共ディブテレックス粉剤 DL (三共アグロ) 2005/07/11

15802: クミアイディブテレックス粉剤 DL (クミアイ化学工業) 2005/07/11

● マラソン粉剤

4630: トモノマラソン粉剤 3 (シンジェンタ ジャパン) 2005/07/28

● BPMC 粒剤

10144: バッサ粒剤 (クミアイ化学工業) 2005/07/28

● エトフェンブロックス乳剤

17901: ムシムシ 100 (シンジェンタ ジャパン) 2005/07/28

● フェンプロバトリン水和剤

17118: トモノロディー水和剤 (シンジェンタ ジャパン) 2005/07/28

(20 ページに続く)