

## PCR を用いたイモゾウムシ病原性 *Farinocystis* 様原虫の検出

森田千尋<sup>1)</sup>・原口 大<sup>2)</sup>・飯山和弘<sup>3)</sup>・青木智佐<sup>3)</sup>・清水 進<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>九州大学大学院生物資源環境科学府, <sup>2)</sup> 沖縄県病害虫防除技術センター, <sup>3)</sup> 九州大学大学院農学研究院

(2008年12月3日受付; 2009年1月11日受理)

### Detection of *Farinocystis*-like protozoa in the West Indian sweet potato weevil, *Euscepes postfasciatus* by PCR

CHIHIRO MORITA, DAI HARAGUCHI, KAZUHIRO IYAMA, CHISA YASUNAGA-AOKI and SUSUMU SHIMIZU

The West Indian sweet potato weevil, *Euscepes postfasciatus*, is an important insect pest of the sweet potato. In 2004, neogregarine oocysts were detected from the adult *Euscepes postfasciatus* at Okinawa Prefectural Plant Protection Center. The parasite was tentatively placed in the genus *Farinocystis* based on morphological characterization reported previously. In this study, to detect the *Farinocystis*-like protozoa in *E. postfasciatus*, oligonucleotide primer pairs were designed to unique areas of 18S rRNA genes of the parasite and the weevil, and PCR was conducted against genomic DNA from 12 adult weevils respectively. The weevil-specific primer pair produced a single 618 bp amplicon against DNA from 5 weevils those were considered to be uninfected under light microscopic observations. In the case of 5 weevils considered to be infected, a 410 bp and a 618 bp amplicons were produced using the parasite-specific and the weevil-specific primer pairs, respectively. On the other hand, a 410 bp amplicon was produced as well as a 618 bp one against DNA from 2 weevils, in spite that they were considered to be uninfected under light microscopic observations. It suggests that detection of the *Farinocystis*-like protozoa in its host, *E. postfasciatus*, is limited to microscopic examination, particularly for early stages of development. Therefore, PCR detection of the *Farinocystis*-like protozoa in *E. postfasciatus* should offer the advantages of increased sensitivity and specificity compared with microscopy.

**Key words :** *Farinocystis*, Oocyst, *Euscepes postfasciatus*, PCR, 18S rRNA

## 緒 言

イモゾウムシ West Indian sweet potato weevil (*Euscepes postfasciatus*) は、西インド諸島を原産とするサツマイモの重要害虫である。日本では1947年に初めて侵入が確認されて後、奄美群島以南の南西諸島に発生が認められている(安田, 2002)。現在、その分布拡大を防ぐため、サツマイモおよび寄生植物であるヒルガオ科の植物の日本本土への持ち込みは植物防疫法により禁止されている。

沖縄県では1994年から、久米島の一部地域を対象に不妊虫放飼法を軸としたイモゾウムシ根絶防除事業が展開されている(山岸・下地, 2000; 久場ら, 2000)。不妊虫放飼法では、大量の不妊化用イモゾウムシの確保が必要とされる。沖縄県病害虫防除技術センターでは、2002年から週当たり300万頭以上の生産を目指してイモゾウムシの大量増殖を開始した。2004年8月初旬まで安定した生産数・放飼数を確保していたが、その後急激な生産数の減少が起り、2004年9月以降、生産数は週当たり150万頭前後で推移した(大野ら, 2006)。この減少と前後して、成虫の短命化と産卵数の減少が見られたため、病気の蔓延が疑われた。そこで、イモゾウムシ成虫を少量の滅菌蒸留水中で磨砕し検鏡したところ、原虫オオシストが検出され

た。沖縄県病害虫防除技術センターでは、新たなイモゾウムシ系統の導入が行われたが、やはり同様の現象がおこり、原虫感染が確認された(大野ら, 2006)。従って、新たに導入した系統がすでに原虫に感染していたにもかかわらず、検鏡では確認できなかった可能性が考えられ、不妊化用イモゾウムシにおける本原虫感染の有無を確実に判断するための手段が求められている。そこで本研究では、PCRを用いた本原虫感染の簡易検出法を検討した。

## 材料と方法

イモゾウムシ: イモゾウムシ成虫は、沖縄県病害虫防除技術センターにおいて継代維持されているもの、または当研究室で維持しているものを供試した。

原虫オオシスト: イモゾウムシ成虫の死亡個体を、滅菌蒸留水中で磨砕し、脱脂綿で濾過した。原虫オオシストの精製は、Percoll密度勾配遠心法(安永ら, 1991)で行った。まず、脱脂綿濾過試料を30% (w/w) Percoll上に重層し、3,000 rpm, 25 °C, 20分間遠心した。得られた沈殿を回収し、滅菌蒸留水に再浮遊させたものを粗精製オオシストとした。次に、Spinco 60Tiローターで22,000 rpm, 6 °C, 20分間遠心して形成した30% (w/w) Percoll密度勾

<sup>1), 2)</sup> 〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1  
Tel: 092-642-3032, Fax: 092-642-4421  
連絡先: yasanaga@grt.kyushu-u.ac.jp

配上に粗精製オオシスト浮遊液を重層し、3,000 rpm, 25 °C, 20 分間遠心した。形成されたオオシストのみを含むバンドを回収し、数回滅菌蒸留水で遠心洗浄して精製オオシストを調製した。

ゲノム DNA の抽出：ゲノム DNA の抽出には、E.Z.N.A.<sup>TM</sup> Insect DNA Isolation Kit (OMEGA) を使用した。プロトコルに従い、イモゾウムシ成虫および原虫オオシストよりゲノム DNA を抽出した。

プライマーの設計：これまでの形態学的観察より、本原虫は Apicomplexa 門, Neogregarinorida 目, *Farinocystis* 属の 1 種である可能性が高いと推察している (森田ら, 2007)。そこで、*Farinocystis* と同じ目に属し、ヒアリ *Solenopsis invicta* に感染する *Mattesia* YHD 株の検出に使用されたプライマーペア (Table 1, p10・p37) (VALLLES and PEREIRA, 2003) を供試して PCR を行った。これらは、Apicomplexa 門原虫の 18S rRNA の保存領域から設計されたものである。この PCR 増幅産物の塩基配列を決定し、その配列を元にイモゾウムシおよび本原虫に特異的なプライマーを設計した (Table 1, Epgsp1・Epgsp2 および Pgpsp1・Pgpsp2)。

PCR：PCR 反応液の総量は 10 μl とし、鋳型 DNA 1.0 μl, 10×Buffer 1.0 μl, dNTP 1.0 μl, 各プライマー 0.05 μl, MgCl<sub>2</sub> 0.6 μl, および AmpliTaq 0.05 μl を含む反応液を使用した。PCR には PC-320 ((株) ASTEC) 使用し、p10・p37 プライマーペアを供試した場合は 94 °C 10 分, 94 °C 15 秒, 60 °C 30 秒, 72 °C 1 分, 35 サイクルで、Epgsp1・Epgsp2 および Pgpsp1・Pgpsp2 のプライマーペアを供試した場合は 94 °C 10 分, 98 °C 5 秒, 55 °C 30 秒, 72 °C 1 分, 35 サイクルの反応条件で行った。PCR 産物の増幅を確認するために、PCR 終了後の反応液 5 μl を 1.5% アガロースゲルを用いて電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色後にトランスイルミネーターで確認した。

原虫感染の検出：当研究室で維持しているイモゾウムシ成虫より任意に 12 個体を選抜し、1 個体ずつ 1.5 ml チューブ中でチューブミキサーを用いて磨砕した後、その磨砕液を光学顕微鏡下 400 倍で観察した。ガメトシストおよびオオシストの有無によりイモゾウムシ個体の感染・非感染を確認した後、上述の方法によりゲノム DNA を抽出し、各特異的プライマーを用いて PCR を行った。

Table 1 List of primers used in this study

Name	Sequence
p10	5' GAAAACGGCCATGCACCAC 3'
p37	5' GGAGARGRAGCCTKAGARAYSG 3'
Pgpsp1	5' GTTGCTGCATCTTCTTCAGC 3'
Pgpsp2	5' CATAAGGTGCTGAAAGTGTCG 3'
Epgsp1	5' CCCCCTAATCGGAATGAGTA 3'
Epgsp2	5' GAGTCATCGGAGGAACGTC 3'

## 結 果

### p10・p37 プライマーペアを用いた PCR

*Mattesia* YHD 株検出 (VALLLES and PEREIRA, 2003) で使用されたプライマーペア p10・p37 を供試し、上述のキットにより抽出した原虫オオシストおよびイモゾウムシのゲノム DNA を鋳型として PCR を行った。その結果、いずれの場合でも約 950 bp の増幅産物が得られた (Fig. 1)。

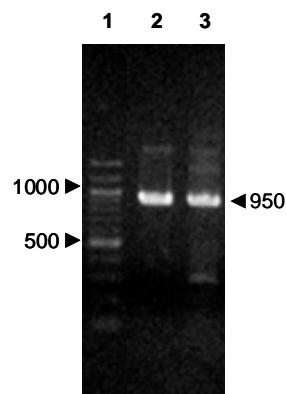


Fig. 1 Banding patterns after PCR with Apicomplexan 18S rRNA specific primers (p10・p37). Lane 1, DNA ladder; lane 2, genomic DNA from protozoan oocyst; lane 3, genomic DNA from *E. postfasciatus*.

### 原虫およびイモゾウムシ特異的プライマーによる PCR

p10・p37 プライマーペアを用いた PCR により得られた増幅産物の塩基配列を基に、本原虫に特異的なプライマーペア (Pgpsp1・Pgpsp2) とイモゾウムシに特異的なプライマーペア (Epgsp1・Epgsp2) を設計した。原虫に特異的なプライマーペア Pgpsp1・Pgpsp2 を用いて、原虫オオシストから抽出したゲノム DNA を鋳型として PCR を行ったところ、410 bp の特異的な増幅産物が得られた (Fig. 2, lane 1)。一方、イモゾウムシに特異的なプライマーペア Epgsp1・Epgsp2 を用いて、イモゾウムシ成虫から抽出したゲノム DNA を鋳型として PCR を行ったところ、618 bp の特異的な増幅産物が確認された (Fig. 2, lane 2)。

### イモゾウムシ個体における原虫感染の検出

本研究室で維持しているイモゾウムシ成虫より任意に選抜した 12 個体を供試して、設計した特異的プライマーペアによる本原虫感染の検出を試みた。各成虫個体の磨砕液の光学顕微鏡観察では、本原虫に感染している場合、ガメトシストや遊離オオシストが観察された (Fig. 3)。イモゾウムシ成虫個体の原虫感染または非感染を顕鏡によって確認後、ゲノム DNA を抽出し PCR を行った (Fig. 4)。その結果、12 個体中、顕鏡により非感染と判断し

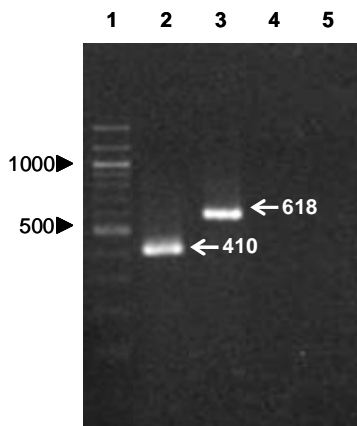


Fig. 2. Banding patterns after PCR with the *Farinocystis*-like protozoan specific primers (Pgsp1 · Pgsp2) and *E. postfasciatus* specific primers (Epgsp1 · Epgsp2). Lane 1, DNA ladder; lane 2, genomic DNA from the protozoan oocyst with the protozoan specific primers; lane 3, genomic DNA from *E. postfasciatus* adults with *E. postfasciatus* specific primers; lane 4, protozoan specific primers only; lane 5, *E. postfasciatus* specific primers only. Lane 4 and 5 indicate negative control.

た 5 個体ではイモゾウムシに特異的な増幅のみが見られ、原虫に特異的な増幅は見られなかった (Fig. 4(a))。一方、検鏡により感染と判断した 5 個体では、イモゾウムシに特異的な増幅と原虫に特異的な増幅の両方が認められた (Fig. 4(b))。しかし、検鏡で非感染と判断したにもかかわらず、PCR により原虫に特異的な増幅が見られた個体が、12 個体中 2 個体存在していた (Fig. 4(c))。

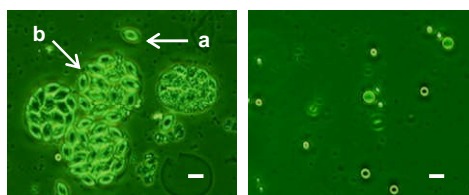


Fig. 3. Light micrographs of grinding solution of *E. postfasciatus*. *Farinocystis*-like protozoa infected *E. postfasciatus* (left) and uninfected one (right). a, free oocyst; b, gametocyst. Scale bars, 10  $\mu$ m.

## 考 察

沖縄県病害虫防除技術センターにおいて、大量増殖されている不妊化用イモゾウムシから分離された本原虫は、ガメトシスト内に 8 個以上のオオシストが含まれていることやそのオオシストの形状がやや細長いレモン型であることなどから、Apicomplexa 門, Neogregarinorida 目, *Farinocystis* 属の 1 種である可能性が高いと推察される (森田ら, 2007)。今回我々は, VALLÉS and PEREIRA (2003) によって報告された *Mattesia* YHD 株の検出を参考にした。*Mattesia* YHD 株は、ヒアリ *S. invicta* に感

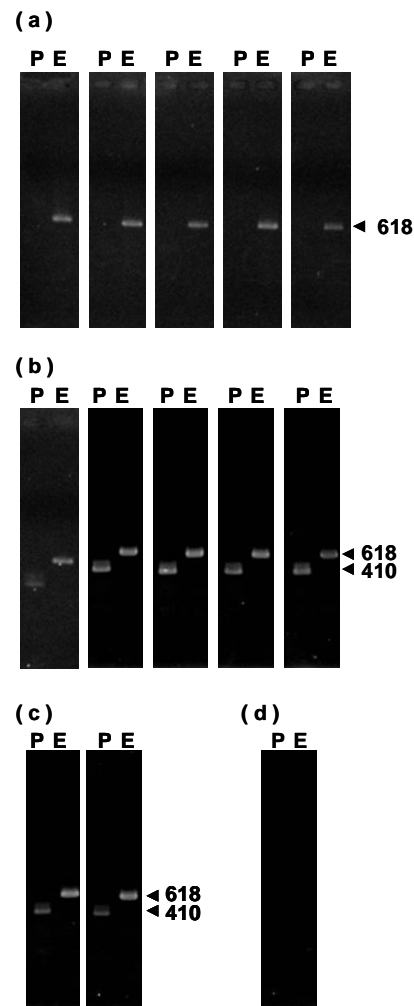


Fig. 4. Detection of *Farinocystis*-like protozoa in *E. postfasciatus* by PCR. P, PCR with protozoan specific primer pair. E, PCR with *E. postfasciatus* specific primer pair. (a) uninfected *E. postfasciatus* under light microscopic observation. (b) infected *E. postfasciatus* under light microscopic observation. (c) uninfected *E. postfasciatus* under light microscopic observation which proved to be infected by PCR. (d) primers only (negative control).

染して、その外殻を黄色にする yellow-head disease (YHD)を引き起こす。*Mattesia* 属原虫は、*Farinocystis* 属と同じ Neogregarinorida 目に属しており、*Mattesia* YHD 株の検出で使用されたプライマーペア (p10 · p37) は、Apicomplexa 門原虫の 18S rRNA の保存領域より設計されている。このプライマーペアを供試して、本原虫オオシストおよびイモゾウムシ成虫から抽出したゲノム DNA を鋳型に PCR を行ったところ、それぞれ約 950 bp の増幅産物が得られた (Fig. 1)。得られた増幅産物の塩基配列を決定し、本原虫とイモゾウムシに特異的なプライマーを設計した。これら特異的プライマーを用いて、イモゾウムシ成虫個体から本原虫感染の検出を試みた。その結果、光学顕微鏡下ではガメトシストやオオシストが観察されず非感染と判断した

個体の中で、原虫に特異的な増幅が見られる個体が存在した (Fig. 4(c))。

本原虫が属すと推察される *Farinocystis* 属で、コクヌストモドキ *Tribolium castaneum* から分離された唯一の記載種 *Farinocystis tribolii* の生活環 (ASHFORD, 1968) を考慮に入れると、ガメトシストが形成される前のステージにある原虫細胞は、その大きさと浸透圧の影響から、簡易的な宿主磨砕液の光学顕微鏡では確認できないと考えられる。沖縄県病害虫防除技術センターにおいて、新たなイモゾウムシ系統の導入後もやはり個体数の減少が起こり、原虫が検出されたのも、上述のような検鏡では確認できないステージの本原虫がすでに感染していたと考えられる。しかし、本研究により、新たに設計した原虫特異的プライマーを用いて PCR を行うことにより、イモゾウムシにおける本原虫感染の高感度な検出が可能であることが明らかとなった。

今後は、健全イモゾウムシに本原虫を人為的に感染させ、各感染ステージ、特に感染初期ステージでの原虫感染の検出を可能にする必要がある。また、実際にイモゾウムシ大量増殖施設において本 PCR 検出法を利用するためには、その条件等の改善が重要である。

## 摘 要

沖縄県病害虫防除技術センター内の大量増殖用イモゾウムシ成虫から *Farinocystis* 様原虫が検出され、不妊化用イモゾウムシにおける本原虫感染の有無を確実に判断するための手段が求められている。そこで本研究では、PCR による本原虫感染の簡易検出法を検討した。イモゾウムシ成虫より任意に選抜した 12 個体を供試し、各個体から抽出したゲノム DNA を鋳型として、原虫およびイモゾウムシに特異的な増幅産物が得られるよう設計したプライマーを用いて PCR を行った。その結果、検鏡により感染と判断したイモゾウムシ成虫 5 個体で原虫に特異的な増幅が見られ、原虫感染が検出された。また、非感染と判断した 5 個体では、イ

モゾウムシに特異的な増幅のみが見られた。しかし、同様に検鏡によって非感染と判断された 2 個体に、イモゾウムシに特異的な増幅とともに原虫に特異的な増幅が認められ、原虫感染が検出された。従って、今回設計したプライマーを用いることで、検鏡では判断できない原虫感染を PCR によって検出することが可能であると考えられた。

## 文 献

- ASHFORD, R. W. (1968) Sporozoan Parasites of *Tribolium castaneum* (Herbst): *Triboliocystis garnhami* Dissanaïke a Synonym of *Farinocystis tribolii* Weiser. *J. Protozool.*, **15**, 466-470.
- 久場洋之・照屋 匡・榊原充隆 (2000) 不妊虫放飼法によるゾウムシ類の根絶 (9) 久米島における根絶実証事業. *植物防疫*, **54**, 483-486.
- 森田千尋・青木智佐・原口 大・小濱継雄・飯山和弘・清水 進 (2007) イモゾウムシ *Euscepes postfasciatus* から分離された *Farinocystis* 様原虫について. *Entomotech*, **31**, 17-19.
- 大野 豪・原口 大・浦崎喜美子・小濱継雄 (2006) サツマイモの大害虫イモゾウムシ-久米島における発生態と防除の現状. *昆虫と自然*, **41**, 25-30.
- VALLES, S. M. and PEREIRA, R. M. (2003) Use of ribosomal DNA sequence data to characterize and detect a neogregarine pathogen of *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *J. Invertebr. Pathol.*, **84**, 114-118.
- 山岸正明・下地幸夫 (2000) 不妊虫放飼法によるイモゾウムシ類の根絶 (7) イモゾウムシの大量増殖・不妊化・マーキング・輸送・放飼. *植物防疫*, **54**, 476-478.
- 安田慶次 (2002) 外来種ハンドブック (日本生態学会編), p. 130, 地人書館, 東京.
- 安永智佐・船越正子・河原畑 勇・早坂昭二 (1991) カイコ病原性微胞子虫 *Nosema* sp. NIS M11 胞子の昆虫培養細胞への接種と増殖. *日蚕雑*, **60**, 450-456.